

AperTO - Archivio Istituzionale Open Access dell'Università di Torino

Funzionalità epatica e renale del sistema immunitario in broiler alimentati con una dieta contaminata con 0,1 mg/kg di Ocratossina A

This is the author's manuscript

Original Citation:

Availability:

This version is available <http://hdl.handle.net/2318/142228> since

Publisher:

S.I.Di.L.V.

Terms of use:

Open Access

Anyone can freely access the full text of works made available as "Open Access". Works made available under a Creative Commons license can be used according to the terms and conditions of said license. Use of all other works requires consent of the right holder (author or publisher) if not exempted from copyright protection by the applicable law.

(Article begins on next page)

**SOCIETÀ ITALIANA
DI DIAGNOSTICA DI LABORATORIO VETERINARIA**

XIII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.

Trani

Castello Svevo

12 - 14 Ottobre 2011

VOLUME DEGLI ATTI

CONSIGLIO DIRETTIVO S.I.Di.L.V.

Alfredo Caprioli, *Presidente*
Elena Bozzetta, *Vice Presidente*
Paolo Cordioli, *Segretario*
Antonio Fasanella, *Tesoriere*
Monica Cagiola, *Membro*
Giuseppe Arcangeli, *Membro*
Sergio Rosati, *Membro*
Gian Luca Autorino, *Past President*
Antonio Battisti, *Revisore dei Conti*
Fabrizio Vitale, *Revisore dei Conti*
Aldo Marongiu, *Revisore dei Conti*

COMITATO SCIENTIFICO

Canio Buonavoglia, *Bari*
Eugenio Chiaravalle, *Foggia*
Doriano Chiocco, *Foggia*
Nicola Decaro, *Bari*
Vito Martella, *Bari*
Cosimo Montagna, *Putignano (BA)*
Agostino Sevi, *Foggia*
Giuseppina Tantillo, *Bari*
Il Consiglio Direttivo S.I.Di.L.V.

COMITATO ORGANIZZATIVO

Barbara Consenti, *Foggia*
Lorenzo Lombardi, *Foggia*
Stefania Losito, *Foggia*
Angelo Miano, *Foggia*

SEGRETERIA ORGANIZZATIVA



M.V. Congressi S.p.a.

Via Marchesi, 26/D - 43126 Parma
Tel. 0521 290191 - Fax 0521 945334
e-mail: sidilv@mvcongressi.it
www.sidilv.org

Prefazione

Dopo alcuni anni il Congresso Nazionale torna in una Regione del Sud, nella splendida cornice della città di Trani. Di questo dobbiamo ringraziare l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata e la Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Bari, che hanno reso possibile l'organizzazione dell'evento. Anche gli Enti Locali hanno dimostrato grande attenzione per il nostro Congresso concedendo il loro patrocinio e supporto all'organizzazione: il comune di Trani, la Provincia di Barletta, Andria, Trani e l'Assessorato Sanità e Servizi Sociali della Regione Puglia.

Il nostro grazie va anche alla Soprintendenza Beni Architettonici e Paesaggistici, che ha concesso l'utilizzo del Castello Svevo quale sede del Congresso: una sede dal fascino storico e architettonico inarrivabile, che compenserà sicuramente qualche eventuale disagio logistico.

Per quanto riguarda l'aspetto scientifico, basti dire che questo volume ospita, oltre alle relazioni ad invito, 163 contributi scientifici, un numero secondo solo a quello dei lavori presentati a Genova lo scorso anno (allora furono 181). Questi numeri testimoniano il consolidamento dell'interesse nei confronti degli eventi organizzati dalla nostra Società.

Anche quest'anno, grazie anche agli esperti che hanno accolto l'invito a partecipare, saranno trattati temi di grande rilevanza scientifica e di sanità pubblica: la diffusione degli stafilococchi meticillino-resistenti, che rappresentano un problema sia per la salute degli animali che per la possibilità di essere trasmessi all'uomo, l'evoluzione dei virus, i metodi di laboratorio più innovativi per mettere in evidenza le frodi alimentari.

Continuando a perseguire l'obiettivo della crescita culturale di tutte le professionalità che operano nei nostri Istituti, il programma tratta temi e ospita contributi che riguardano tutti gli aspetti della diagnostica di laboratorio veterinaria: le malattie e il benessere degli animali domestici e selvatici, le contaminazioni chimiche e biologiche degli alimenti di origine animale e vegetale, l'impatto della zootecnia sull'ambiente. Inoltre, anche questa edizione comprende il Corso di Aggiornamento per tecnici di laboratorio: questo tocca argomenti di grande interesse quali gli antigeni ricombinanti e l'epidemiologia molecolare e testimonia ancora una volta la nostra attenzione per questa categoria.

Un impegno del Consiglio Direttivo eletto a Genova era stato quello di perseguire la crescita culturale della Società anche attraverso il riconoscimento della qualità dell'attività scientifica, soprattutto nei riguardi dei giovani ricercatori. A tal fine, il Comitato Scientifico ha dedicato grande attenzione alla selezione dei contributi scientifici da destinare alla presentazione orale, e per questo lavoro lo ringraziamo caldamente. Inoltre, è stato deciso di utilizzare un criterio di selezione diverso e più oggettivo per attribuire i premi ai migliori lavori: invece della selezione durante il Congresso stesso, spesso difficoltosa per il gran numero di lavori da valutare nei tempi ristretti concessi dal programma, saranno premiati i lavori che, nell'anno successivo alla presentazione al Congresso, saranno pubblicati su riviste "*peer reviewed*" con *impact factor*. La premiazione avverrà quindi durante il Congresso successivo. Il meccanismo di valutazione è stato applicato in via sperimentale ai lavori presentati a Genova e pubblicati entro il mese di Settembre 2011 (fonte PubMed), che saranno premiati in un'apposita sessione nella giornata di Giovedì.

Infine, nell'auspicare ai convenuti l'augurio di buon lavoro e di una piacevole permanenza, rivolgiamo un sincero riconoscimento ed apprezzamento al Comitato Organizzativo, allo staff di *M.V. Congressi* che ha collaborato alla realizzazione del XIII° Congresso, agli sponsor del settore che hanno aderito numerosi e ai Direttori degli Istituti Zooprofilattici che, consentendo la larga partecipazione di numerosi operatori, rendono possibile la continua crescita di questa Società.

Trani, 12 Ottobre 2011

Il Consiglio Direttivo

**Il XIII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. si svolge
con il patrocinio di:**

Comune di Trani

Provincia di Barletta, Andria, Trani

Regione Puglia, Assessorato alla Sanità

**Il Comitato Organizzatore del XIII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.
è grato ai seguenti Enti ed Aziende
per il fattivo contributo alla realizzazione dell'evento**

**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA PUGLIA E DELLA BASILICATA**

**FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA,
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BARI**

BIO-RAD LABORATORIES

EUROCLONE

FOSS ITALIA

IDEXX

ID-VET

LIFE TECHNOLOGIES ITALIA

MEDICAL SERVICE 2000

PALL GENEDISC TECHNOLOGIES

PROMEVET

QIAGEN

TECAN ITALIA

INDICE

LETTURE PLENARIE, COMUNICAZIONI ORALI

LE COMPETENZE COMUNICATIVO-RELAZIONALI NELLA PROFESSIONE

Donti N.	25
APPLICAZIONE DEL DR-CALUX QUALE METODO DI SCREENING: CONFRONTO DEI DATI OTTENUTI CON IL METODO DI RIFERIMENTO HRGC-HRMS Bertasi B., Maccabiani G., Fusini F., Tilola M., Gasparini M., Nassuato C., Ferretti E., Losio M.N.	28
OTTIMIZZAZIONE E VALIDAZIONE DI UN METODO IN ICP/MS PER LA DETERMINAZIONE DI METALLI PESANTI ED OLIGOELEMENTI NEI MANGIMI Chiaravalle A. E., Miedico O., Laconca L., Pompa C., Tarallo M.	30
DETERMINAZIONE RADIOCHIMICA DELLO STRONZIO-90 NEL LATTE MEDIANTE SCINTILLATORE LIQUIDO AD ULTRA BASSO FONDO dell'Oro D., Bortone N., La Porta M., Marchesani G., Mangiacotti M., Chiaravalle A.E.	33
RISULTATI DEI CONTROLLI PER LA RICERCA DI ALIMENTI O INGREDIENTI TRATTATI CON RADIAZIONI IONIZZANTI Marchesani G., Mangiacotti M., Floridi F., Siragusa G., Chiaravalle A. E.	36
ANALISI FILOGENETICA ED EVOLUZIONISTICA DEI CEPPI INFLUENZALI SUINI H1N2 IN ITALIA Moreno A., Sozzi E., Lelli D., Foni E., Chiapponi C., Fontana R., Alborali L., Cordioli P.	39
QUADRO EPIDEMIOLOGICO RISULTANTE DAL PIANO DI SORVEGLIANZA PER L'ANEMIA INFETTIVA DEGLI EQUIDI NEL QUADRIENNIO 2007-2010 Forletta R., Ferri G., Nardini R., Ricci I., Scicluna M.T., Scaramozzino P., Autorino G.L., Sala M.	41
L'EMERGENZA DEGLI STAFILOCOCCI METICILLINO-RESISTENTI IN AMBITO VETERINARIO: PROBLEMATICHE DI SANITÀ PUBBLICA E ANIMALE Guardabassi L.	44
INDAGINE PER S. AUREUS E S.AUREUS METICILLINO-RESISTENTE (MRSA) IN LATTE CRUDO DI MASSA BOVINO DI ALLEVAMENTI DELLA REGIONE LAZIO Giacinti G., Tammaro A., Sagrafoli D., Proietti A., Veschetti M.C., Bicocchi R., Franco A., Carratù D., Battisti A., Cordaro G., Amatiste S.	46
INDAGINE SULLA PRESENZA DI STAPHYLOCOCCUS AUREUS E DI MRSA NEL LATTE DI MASSA DELLE AZIENDE BOVINE DELLA PROVINCIA DI LODI Pozzi F., Vezzoli F., Nassuato C., Franco A., Ianzano A., Battisti A., Luini M.	48
STUDIO LONGITUDINALE SULLA COLONIZZAZIONE NASALE DA <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> METICILLINO RESISTENTE (MRSA) IN UN ALLEVAMENTO SUINO A CICLO CHIUSO Merialdi G., Galletti E., Granito G., Franco A., Battisti A., Martelli P.	50
STAFILOCOCCI COAGULASI POSITIVI METICILLINO-RESISTENTI NEL CANE: SORVEGLIANZA PASSIVA, 2008-2011 Franco A., Bruni G., Carratù D., Iurescia M., Buccella C., Cerci T., Dottarelli S., Ianzano A., Sorbara L., Alba P., Alderete P. A., Lorenzetti R., Battisti A.	52
PROFILASSI E RISANAMENTO DI UN GREGGE OVINO INTERESSATO DA UN FOCOLAIO DI MASTITE DA <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i> Marogna G., Fiori A., Barbato A., Schianchi G., Leori G.S.	54

ISOLAMENTO DA GAZZA DI UN NUOVO MICRORGANISMO APPARTENENTE ALLA FAMIGLIA <i>CHLAMYDIACEAE</i> Rizzo F., Vicari N., Ameri M., Renna G., Labalestra I., Robetto S., Orusa R., Mandola M.L.	56
IDENTIFICAZIONE DI UN NUOVO ASTROVIRUS IN CONIGLI CON FORME ENTERICHE Martella V., Moschidou P., Catella C., Lorusso E., Larocca V., Pinto P., Circella E., Magistrati C., Lavazza A., Buonavoglia C.	58
FEBBRE CATARRALE MALIGNA IN BANTENG (<i>BOS JAVANICUS</i>) DI UN GIARDINO ZOOLOGICO ITALIANO Autorino G.L., Eleni C., Frontoso R., Cocumelli C., Rosone F., Di Cerbo P., Altigeri A., Marianelli M., Lorenzetti R., Manna G., Friedrich K., Scicluna M.T.	60
INDAGINE SULLA PREVALENZA DELLA LEPTOSPIROSI NEI CINGHIALI DEL CENTRO-NORD SARDEGNA Piredda I., Palmas B., Noworol M., Canu M., Fiori E., Picardeau M., Tola A., Pintore A., Ponti N.	63
GOING BEYOND THE LAW FOR THE MANAGEMENT OF AN <i>OUTBREAK OF LEP-TOSPIRA</i> SEROVAR HARDJO INFECTION IN A LARGE INTENSIVE DAIRY CATTLE HERD Scicluna M.T., Rinaldi G., Della Marta U., Simula M., Caprioli A., Rosone F., Manna G., Autorino G.	65
SVILUPPO DI UNA PROTEINA CHIMERICA BASATA SULLE PROTEINE GP51 P24 DEL VIRUS DELLA LEUCOSI BOVINA ENZOOTICA De Giuseppe A., Casciari C., Ferrante G., Bazzucchi M., Forti K., Torresi C., Rizzo G., Feliziani F.	68
<i>BACILLUS CEREUS</i> NEL LATTE A MEDIA DURATA, COSTRUZIONE DI UN MODELLO DI MICROBIOLOGIA PREDITTIVA Cosciani Cunico E., Fierro A., Finazzi G., Ruggiero V., Oliverio E., Sabatucci G., Losio M.N., Varisco G.	71
PREVALENZA E SIEROTIPI DI CEPPI DI <i>SALMONELLA</i> SPP. ISOLATI DA CARNI FRESCHE DI POLLO E TACCHINO IN VENETO (ITALIA), 2008-2010 - RISULTATI PRELIMINARI Paiusco A., Lettini A.A., Barco L., Comin D., Mioni R., Ricci A.	74
VERIFICA DEI CRITERI DI IGIENE IN UN MACELLO DI OVINI E SUINI: STUDIO DEI CEPPI DI <i>SALMONELLA</i> spp ISOLATI Goffredo E., Casoli L., Azzariti L., Castelluccio A., Carosielli L., Longo A., Dalla Pozza M.C.	76
CARATTERIZZAZIONE DI ISOLATI DI <i>SALMONELLA</i> ENTERICA 4,[5],12:i:- DT193 ASSOCIATI A DUE DISTINTI EPISODI DI SALMONELLOSI Barco L., Ramon E., Dalla Pozza M.C., Longo A., Lettini A.A., Minorello C., Saccardin C., Dionisi Am., Ricci A.	79
RICERCA DI <i>Escherichia coli</i> PRODUTTORI DI VEROCITOTOSSINA IN SEMI DESTINATI ALLA PRODUZIONE DI GERMOGLI: PROBLEMATICHE ED ESPERIENZE DI LABORATORIO Tozzoli R., Morabito S., Scavia G., Ferreri C., Grande L., Michelacci V., Minelli F., Marziano M.L., Caprioli A.	81
INDAGINE EPIDEMIOLOGICA SULLA PRESENZA DI <i>Campylobacter jejuni</i> NEL LATTE DI MASSA DELLE AZIENDE BOVINE DELLA PROVINCIA DI LODI Santoro E., Benedetti V., Invernizzi E., Miccolupo A., Nassuato C., Parisi A., Vezzoli F., Luini M.	83
MONITORAGGIO SULLA PRESENZA DI NOROVIRUS, VIRUS DELL'EPATITE A E CONTAMINAZIONE BATTERICA IN MOLLUSCHI EDULI LAMELLIBRANCHI NELLA REGIONE SARDEGNA Bazzardi R., Fattaccio M.C., Canu A., Salza S., Marongiu E., Pisanu M.	85

TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI <i>FRANCISELLA TULARENSIS</i> ISOLATI IN ITALIA Vicari N., Manfredini A., Prati P., Bellotti M., Barbieri I., Fabbi M.	88
DIAGNOSI DI <i>YERSINIA PESTIS</i> IN DUE BAMBINI MORTI DURANTE L'EPIDEMIA CHE COLPI' IL REGNO DI NAPOLI TRA IL 1656 E IL 1658 Fasanella A., Garofolo G., Scasciamacchia S., Mercurio V., Balestrucci A., Bolsi I., Giangrossi L., Serrecchia L.	90
FOOD AUTHENTICITY TESTING: THE ROLE OF THE LABORATORY González Alonso M.I.	92
ISTOLOGIA E FRODI ALIMENTARI: UN METODO ACCURATO E ROBUSTO PER IDENTIFICARE LO STATO DI CONSERVAZIONE DEI PRODOTTI ITTICI Bozzetta E., Pezzolato M., Cencetti E., Meloni D., Abramo F., Mutinelli F., Ingravalle F., Teneggi E.M.	94
L' IDENTIFICAZIONE DI SPECIE ITTICHE A TUTELA DELLA SALUTE DEL CONSUMATORE E DELLA QUALITÀ DEL PRODOTTO: INDAGINE SUL MERCATO ITALIANO NEGLI ANNI 2009-2011 Magnabosco C., Civettini M., De Battisti C., Cattoli G., Arcangeli G.	96
IMPIEGO DEL DNA BARCODING PER L'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE DI PESCI IN ITALIA Cutarelli A., Amoroso M.G., Girardi S., De Roma A., Guarino A., Galiero G., Corrado F.	98
RICERCA E QUANTIFICAZIONE DI DNA BOVINO IN MOZZARELLA DI BUFALA MEDIANTE REAL-TIME PCR Maccabiani G., D'Amico S., Fusini F., Finazzi G. D., Daminelli P., Bertasi B., Losio M. N., Varisco G.	100
SVILUPPO DI UN METODO MOLECOLARE PER LA RICERCA DI <i>ESCHERICHIA COLI</i> O104:H4 PRODUTTORE DI VEROCITOTOSSINA (VTEC O104) NEGLI ALIMENTI Michelacci V., Morabito S., Tozzoli R., Grande L., Scavia G., Ferreri C., Minelli F., Marziano M.L., Caprioli A.	103
SENSORI ELETTROCHIMICI A DNA PER LO SCREENING DI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI Lanzone V., Del Carlo M., Compagnone D., Galiero G., De Roma A., Corrado F.	106
IMPIEGO DI JOHNINA SPERIMENTALE NEL GAMMA-INTERFERON TEST IN BOVINI INFETTI DA <i>MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP. PARATUBERCULOSIS</i> : DATI PRELIMINARI Mazzone P., Vitale N., Ricchi M., Corneli S., Mangili P.M., Papa P., Caporali A., Biagetti M., Checcarelli S., Ciullo M., Gradi M., Guglielmi F., Fumanti P., Benedetti F., Raber A., Arrigoni N., Cagiola M.	108
IFN- γ TEST PER LA DIAGNOSI DI TUBERCOLOSI BOVINA NEL SUINO NERO SICILIANO Pesciaroli M., Mazzone P., Marianelli C., Corneli S., Russo M., Aronica V., Biagetti M., Ciullo M., Pasquali P., Di Marco V.	111
IL VIRUS DELL'EPATITE E SUINA IN ITALIA: SETTE ANNI DI STUDI, DAGLI ALLEVAMENTI AL PRODOTTO FINITO Di Bartolo I., Angeloni G., Ponterio E., Maione E., Ostanello F., <u>Ruggeri F.M.</u>	114
PARAMETRI SIEROLOGICI E VIROLOGICI IN CAPRE VACCINATE CON SRLV CEPPO ROCCAVERANO ED INFETTATE CON CEPPO ETEROLOGO CAEV-CORK Bertolotti L., Mazzei M., Camero M., Profiti M., Cavalli A., De Meneghi D., Carrozza M.L., Perona G., Rosati S.	116

CORONAVIRUS RICOMBINANTI DEL CANE

Decaro N.	118
STANDARDIZZAZIONE DI UN PROTOCOLLO MLVA PER LA GENOTIPIZZAZIONE DI <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> DI ISOLAMENTO UMANO E ALIMENTARE Parisi A., Miccolupo A., Latorre L., Bilei S., Cogoni M.P., Costa A., Santagada G.	120
APPLICAZIONE DELLA TECNICA MLVA NELLE STRATEGIE DI ERADICAZIONE DELLA BRUCELLOSI Borriello G., Cozza D., Loporchio R., Valvini O., Guarino A., Galiero G.	123
CARATTERIZZAZIONE DI MOLLUSCHI BIVALVI <i>LITOPHAGA LITOPHAGA</i> (DATTERI DI MARE): ANALISI DI CONTAMINANTI ED OLIGOELEMENTI NEI DIVERSI COM- PARTI BIOLOGICI Chiaravalle A. E., Bisceglia D., Miedico O., Laconca L., Pompa C., Tarallo M., Ferrara A.	125
OTTIMIZZAZIONE E VALIDAZIONE DI UN METODO GC/ECD PER LA DETERMINA- ZIONE DI NDL-PCBs IN PRODOTTI ITTICI Nardelli V., Casamassima F., Cristino M., Gesualdo G.	128

POSTER

STUDIO EPIDEMIOLOGICO SULLA SIEROPREVALENZA DI BRUCELLA MELITENSIS E BRUCELLA ABORTUS NEL CANE Adone R., Di Prisco F., D'Alessio N., Tamburro C., Francia M., Pasquali P., Guarino A.	133
CARATTERIZZAZIONE DI UN SISTEMA DOSIMETRICO AD ALANINA PER APPLICA- ZIONI NEL CAMPO DELLA FOOD IRRADIATION Altieri P. R., Mangiacotti M., Marchesani G., Chiaravalle A. E.	135
IL BOTULISMO ANIMALE: RECENTI SVILUPPI DI UNA MALATTIA ANTICA Anniballi F., Fiore A., Auricchio B., Fenicia L.	138
INDAGINE SULLA PRESENZA DI RODENTICIDI ANTICOAGULANTI NELLE ESCHE E NEGLI ORGANI DI ANIMALI DOMESTICI AVVELENATI Armentano A., Iammarino M., Lo Magro S., Muscarella M.	140
E.COLI VEROCITOTOSSICI NELLA FILIERA LATTIERO CASEARIA OVICAPRINA DEL GARGANO (PUGLIA-ITALY): PRIMI DATI DI PREVALENZA Azzarito L., Crisetti E., D'Alessandro M., Di Stefano A., Nardella M.C., Chiocco D., La Salandra G.	142
PRESENZA DI NOROVIRUS IN MOLLUSCHI EDULI LAMELLIBRANCHI IN UN IM- PIANTO DI DEPURAZIONE DEL GOLFO DI LA SPEZIA (2008-2010) Barbaro A., Battistini R., Vitale N., Chiavacci L., Rossini I., Gorla M., Sant S., Ercolini C., Serracca L.	144
PRESENZA DI <i>Paenibacillus larvae</i> GENOTIPO ERIC II IN ITALIA. DIFFERENZE FENOTIPICHE TRA IL GENOTIPO ERIC I E IL GENOTIPO ERIC II Bassi S., Paganelli G.L., Carpana E., Gelmini L., Salogni C., Carra E.	146
INDAGINE SULLA QUALITA' DELL'ACQUA DI ABBEVERATA IN SARDEGNA NEL TRIENNO 2008-2010: CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE Bella E., Vodret B., Mancuso M.R., Caneglias E., Marongiu E.	148
PRESENZA DI <i>E. COLI</i> VTEC IN CARNI E SALUMI A BASE DI CARNE DI CERVO Bilei S., De Santis P., Bichi G., Flores Rodas E.M., Greco S., Tolli R., Morabito S., Pecchi S., Scaramella L., Caprioli A.	151

CARATTERIZZAZIONE GENOTIPICA E FENOTIPICA DI CEPPI DI <i>SALMONELLA</i> TYPHIMURIUM ISOLATI DA SINDROMI GASTROENTERICHE IN VITELLI BUFALINI Borriello G., Pesciaroli M., Lucibelli MG, Cerrone A., Riccone N., Paradiso R., Ammendola S., Graziani C., Battistoni A., Pasquali P., Galiero G.	154
FOCOLAI DI BOTULISMO AVIARE NEL LAZIO: DATI PRELIMINARI Bossù T., Eleni C., De Liberato C., Di Egidio A., Magliano A., Grifoni G., De Santis P., De Angelis V., Di Domenico I., Scaramozzino P., Bilei S.	156
<i>SALMONELLA</i> TYPHIMURIUM IN UN EPISODIO DI MORTALITÀ IN VERDONI (<i>CARDUELIS CHLORIS</i>) A VITA LIBERA Bregoli M., Di Giusto T., Deotto S., Longo A., Squecco G., Cocchi M., Barco L.	158
CONFRONTO DI DUE REAL TIME PCR PER LA DIAGNOSI DELLA MALATTIA DI AUJESZKY Bresaola M., Canelli E., Catella A., Lelli D., Sozzi E., Cordioli P.	160
STIMA DELLA POPOLAZIONE DEI CANI DI PROPRIETÀ RESIDENTI NEI MUNICIPI DI COMPETENZA DELLA ASL ROMA B Caminiti A., Meoli R., Sala M., Alfonsi P., Rombolà P., Battisti S., Eleni C., Spallucci V., Scaramozzino P.	162
ABORTI CORRELATI CON INFEZIONI BATTERICHE IN RUMINANTI DA REDDITO BACTERIAL RELATED ABORTION IN PRODUCTION RUMINANTS Caracappa S., Marineo S., Vesco G., Torina A., Galluzzo P., Guercio A.	164
INTOSSICAZIONE DA ENDOSULFAN IN UN ALLEVAMENTO DI BOVINI IN SICILIA Caracappa S., Currò V., Vicari D., Vella A., Antoci F., Macaluso A., Iuculano G., Giangrosso G., Ferrantelli V.	166
IDENTIFICAZIONE DI ALIMENTI IRRADIATI A SCOPO CONSERVATIVO ATTRAVERSO L'USO DELLA SPETTROSCOPIA ESR Cardamone C., Di Noto A.M., Palumbo P., D'Oca M.C., Bartolotta A.	168
<i>MYCOPLASMA BOVIS</i> DAL LATTE BOVINO: METODO BIOMOLECOLARE PER LA DETERMINAZIONE RAPIDA E L' IDENTIFICAZIONE DI SPECIE - RISULTATI PRELIMINARI - Carfora V., Marri N., Tammaro A., Rosa G., Giangolini G., Giacinti G., Amatiste S.	170
ISOLAMENTO DI <i>ACHOLEPLASMA LAIDLAWII</i> DA LATTE DI MASSA OVINO Casalinuovo F., Cillara G., Sanna G., Tola S., Guarino A.	172
CARATTERIZZAZIONE DI <i>MICROCOSMUS SULCATUS</i> (COQUEBERT,1797): ANALISI DI METALLI PESANTI, OLIGOELEMENTI E RADIONUCLIDI γ -EMETTITORI Chiaravalle A. E., Carosielli L., Bisceglia D., Ferrara A., Bortone N., Miedico O.	174
MONITORAGGIO SULLA PRESENZA DI METALLI PESANTI ED OLIGOELEMENTI NEI MANGIMI COMMERCIALIZZATI IN PUGLIA Chiaravalle A. E., Miedico O., Laconca L., Pompa C., Tarallo M.	177
CONTAMINAZIONE AMBIENTALE DA DEIEZIONI DI CANI: PROBLEMA DI SALUTE PUBBLICA? Cinquelpalmi V., D'Amato F., Monno R., De Vito D., Soleo L.	180
SVILUPPO DI UN METODO ELETTRORCHIMICO BASATO SULLA VOLTAMMETRIA SWASV PER LA DETERMINAZIONE DI PIOMBO E CADMIO IN PRODOTTI DELLA PESCA Corrado F., De Roma A., Galiero G., Guarino A., Esposito M., Maglio P., Del Carlo M., Malascorta R., Compagnone D.	182

CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI CEPPI DI <i>STAPHYLOCOCCUS PSEUDINTERMEDIUS</i> METICILLINO RESISTENTI ISOLATI IN UN ALLEVAMENTO DI CANI DEL VENETO. Corrò M., Rota A., Milani C., Drigo I., Perin R., Börjesson S.	184
ASPETTI IGIENICO-SANITARI E QUALITATIVI DI MOLLUSCHI CEFALOPODI AL COMMERCIO Costa A., Alio V., Russo Alesi E.M., Sciortino S., Di Noto A.M.	187
PCR-SSCP PER L'IDENTIFICAZIONE DI <i>PROTOTHECA ZOPFII</i> GENOTIPO 2 ISOLATE DA CAMPIONI DI LATTE BOVINO Cremonesi P., Chessa S., Ricchi M., Pozzi F., Castiglioni B., Luini M.	190
INDAGINE PRELIMINARE SULLA DIFFUSIONE DI CEPPI DI <i>PASTEURELLA SPP.</i> E <i>MANNHEIMIA HAEMOLYTICA</i> IN SICILIA Currò V., Marineo S., Galuppo L., Piraino C., Lipari L., Caracappa S.	192
QUALE ATTENZIONE NEI CONFRONTI DEL CONSUMATORE ALLERGICO IN REGIONE PIEMONTE? D'Errico V., Vitale N., Parisani V., Fragassi S., Bianchi DM, Gallina S., Decastelli L., Chiavacci L., Barbaro A.	194
MESSA A PUNTO DI METODICA PCR PER LA DIAGNOSI EZIOLOGICA DI ENCEFALITOOZONOSI DEL CONIGLIO De Nadai V., Daminelli P., Maccabiani G., Zanardini N., Lavazza A.	196
OCRATOSSINA A NELL'ALIMENTAZIONE UMANA: VALIDAZIONE DI UN METODO IMMUNOENZIMATICO. De Pace R., Franchino C., Vita V.	199
IMPORTAZIONE DI GRANO DURO E TENERO IN PUGLIA NELL' ANNO 2010: MONITORAGGIO DELLE PRINCIPALI MICOTOSSINE E DELLA QUALITÀ MERCEOLOGICA De Pace R., Vita V., Menga V., Fares C.	201
CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEI CEPPI DI PCV2 CIRCOLANTI NEI CINGHIALI IN SARDEGNA Dei Giudici S., Angioi P., Manca A.F., Vidili M.L., Zinellu S., Oggiano A.	203
PRESENZA DI LARVE DI ANISAKIDAE IN TOTANI (<i>ILLEX COINDETII</i>) PESCATI NEL MAR LIGURE Di Donfrancesco B., Righetti M., Serracca L., Gustinelli A., Fioravanti M.L., Cencetti E., Giorgi I., Dellepiane M., Ercolini C., Prearo M., Pavoletti E.	205
IL PIANO DI SORVEGLIANZA SULLA CONTAMINAZIONE DA DIOSSINE IN REGIONE CAMPANIA: CRITERI DI ATTUAZIONE E MONITORAGGIO DELLE MATRICI ALIMENTARI Esposito M., Cavallo S., Colarusso G., Rosato G., Pellicanò R., Serpe F.P., Baldi L.	207
VALUTAZIONE DEL RUOLO DEL SISTEMA CHEMOCHINICO CXCR4-SDF1 IN CARCINOMI MAMMARI CANINI E FELINI MEDIANTE ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA Ferrari A., Petterino C., Florio T., Barbieri F., Purificato I., Enache D., Tiso M., Campanella C., Vito G., Ratto A.	210
DNA COMET ASSAY: STUDIO DEI PRINCIPALI FATTORI DI INFLUENZA NELL'IDENTIFICAZIONE DI CARNI IRRADIAE Floridi F., Siragusa G., Mangiacotti M., Marchesani G., Chiaravalle A. E.	212
INDAGINI MOLECOLARI PER L'IDENTIFICAZIONE DI CEFALOSPORINASI A SPETTRO ESTESO IN <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> ISOLATI DA CANI E GATTI Franco A., Amoruso R., Bruni G., Cordaro G., Di Matteo P., Donati V., Feltrin F., Lorenzetti S., Onorati R., Zini M., Battisti A.	215

INDAGINE SULLA DIFFUSIONE DI MALATTIE SOSTENUTE DA VIRUS, BATTERI E PARASSITI IN CINGHIALI PROVENIENTI DALLA CAMPANIA E CALABRIA Fusco G., Buonanno M., Aprea G., Veneziano V., D'Alessio N., Cozzolino L., Pugliese AM., Marati L., Di Prisco F., Galiero G., Guarino A.	216
NOROVIRUS IN MOLLUSCHI BIVALVI: COMPETENZE E CONOSCENZE TRA STUDENTI E MITILICOLTORI Galleggiante Crisafulli A., Vitale N., Rubinetti F., Serracca L., Ercolini C., Chiavacci L., Barbaro A.	219
INDAGINE EPIDEMIOLOGICA A SEGUITO DI MTA IN PIEMONTE - GIUGNO 2011 Gallina S., Bianchi DM., Bellio A., Civalleri N., Serra R., Zaccaria T., Gulino M., Maggi C., Decastelli L.	221
VERIFICA DEL POTENZIALE BATTERIOGINOGENICO DEL <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> subsp. <i>CREMORIS</i> Galuppini E., D'Amico S., Bertasi B., Berta V., Panteghini C., D'Ippolito N., Varisco G.	223
CONFRONTO TRA DIFFERENTI METODICHE COLTURALI PER LA DIAGNOSI DI MASTITE DA MYCOPLASMA Garbarino C.A., Cammi G., Ricchi M., Arrigoni N.	226
EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DEL <i>BACILLUS ANTHRACIS</i> IN ITALIA Garofolo G., Fasanella A.	228
DIAGNOSI DI PARVOVIRUS CANINO E CARATTERIZZAZIONE DELLE VARIANTI ANTIGENICHE PRESENTI IN PIEMONTE Giorgi I., Dondo A., Rossi F., Zoppi S., Sant S., Monnier M., Grattarola C.	230
DIFFUSIONE DI <i>GIARDIA DUODENALIS</i> IN ALLEVAMENTI BOVINI STANZIALI IN AREA METROPOLITANA (PALERMO) Glorioso N. S., Reale S., Migliazzo A., Lupo T., Chifari P., Alberti P., Galante A., Lo Verde V., Piazza M., Rapisarda G., Vitale F.	232
DESCRIZIONE DI UN FOCOLAIO DI SALMONELLOSI E BOTULISMO IN VOLATILI ACQUATICI IN PIEMONTE Grattarola C., Zoppi S., Fezia G., Vencia W., Corvonato R.L., Rossi F., Giorgi I., Dondo A.	234
DETERMINAZIONI MICROBIOLOGICHE SU VEGETALI DI I E IV GAMMA: DATI PRELIMINARI Greco S., De Santis P., Flores Rodas E.M., Bogdanova T., Cesarano D., De Angelis V., Di Domenico I., Bilei S.	236
GLI AUDIT INTERNI PRESSO L'ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLE REGIONI LAZIO E TOSCANA Guzzo S., Palleschi G., Tardiola A., Guarducci M.	239
INDAGINE SULLA PRESENZA DI ACIDO ASCORBICO NELLE PREPARAZIONI DI CARNI FRESCHE NON PRECONFEZIONATE Iammarino M., Di Taranto A.	241
UPL REAL TIME PCR e LAMP: VALUTAZIONE COMPARATIVA DI NUOVE TECNICHE BIO-MOLECOLARI PER LA DIAGNOSI DI PESTE SUINA AFRICANA Iscaro C., Fernández-Pinero J., Leblanc N., Rossi E., Giammarioli M., De Mia G.M.	243
RICERCA DIRETTA DI VTEC IN MOLLUSCHI BIVALVI PROVENIENTI DA UN BANCO NATURALE Lamon S., Mureddu A., Marceddu M., Consolati S., Mazza R., Meloni D., Mazzette R.	245

IDENTIFICAZIONE DI MAMMALIAN ORTHOREOVIRUS TYPE 3 IN <i>PIPISTRELLUS KUHLII</i> Lelli D., Moreno A., Lavazza A., Canelli E., Tassinari M., Soriani A., Fontana R., Barbieri I., Cordioli P.	247
OTTIMIZZAZIONE E VALIDAZIONE DI UN METODO HPLC/DAD PER LA DETERMINAZIONE SIMULTANEA DI DODICI SULFAMIDICI NEL MUSCOLO Lo Magro S., Armentano A., Palermo C., Muscarella M.	249
PRESENZA DI TOSSINE ALGALI DEL TIPO P.S.P. (<i>PARALYTIC SHELLFISH POISON</i>) IN MITILI ALLEVATI NELLA REGIONE SARDEGNA E GESTIONE DELLE NON CONFORMITA' Lorenzoni G., Arras I., Sanna G., Marongiu E., Piras G., Salza S., Mudadu A., Tedde T., Virgilio S.	251
ABORTO DA VIRUS DELLA DIARREA BOVINA TIPO 3 Lucente M.S., Mari V., Sciarretta R., Cirone F., Larocca V., Amorisco F., Lorusso E., Buonavoglia C., Decaro N.	253
INDAGINE SULLA PRESENZA DI <i>COXIELLA BURNETII</i> IN FETI BOVINI E BUFALINI NELLA REGIONE CAMPANIA Lucibelli M.G., Auriemma C., Borriello G., Alfano F., Gallo A., De Carlo E., Galiero G.	255
DETERMINAZIONE DEI PESTICIDI ORGANOCLOPURATI MEDIANTE GC-ECD, PER INDAGINI TOSSICOLOGICHE IN CANI DELLA REGIONE SICILIA, ANNI 2009-2010. Macaluso A., Cicero A., Giangrosso G., Billone E., Vella A., Ferrantelli V.	257
SU UN CASO DI INFESTAZIONE DA <i>PIOPHILA CASEI</i> IN UN FORMAGGIO DI LATTE DI PECORA PRODOTTO NEL LAZIO Magliano A., De Liberato C., Flores Rodas E.M., Bogdanova T., Greco S., Del Frate S., Bilei S.	259
L'UTILIZZO DEI FERTILIZZANTI ORGANICI E LA PRESENZA DI SPICOLE OSSEE NEI TERRENI ADIBITI A COLTIVAZIONI AD USO ZOOTECNICO: DATI PRELIMINARI Marchis D., Prudente C., Benedetto A., Amato G., Poma Genin E., Millone A., Dutto D., Pellegrino M., Abete M.C.	261
<i>AEDES ALBOPICTUS</i> : SISTEMA DI SORVEGLIANZA ENTOMOLOGICA IN UMBRIA 2009-2010 Maresca C., Berretta C., Biasini G., Mangili P., Scoccia E., Tentellini M., Zingaretti G., Grelloni V.	263
ISOLAMENTO DAL LATTE BUFALINO DI BATTERI LATTICI CON POTENZIALE ATTIVITA' ANTIMICROBICA NEI CONFRONTI DI PATOGENI MASTITICI Marianelli C., Martucciello A., Campanile G., Armas F., Pasquali P., De Carlo E.	265
PRODUZIONE ED USO DI UN VACCINO STABULOGENO PER LA PROFILASSI DELLE MASTITI OVINE DA <i>STREPTOCOCCUS SUIIS</i> Marogna G., Bacciu D., Salis F., Barbato A., Fiori A., Uzzau S., Schianchi G.	267
COINFEZIONE MAMMARIA DA <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> E <i>STREPTOCOCCUS UBERIS</i> IN UNA PECORA SARDA: A CASE REPORT Marogna G., Rocca S., Farigu S., Cubeddu T., Serra G., Barbato A., Fiori A., Schianchi G.	269
DESCRIZIONE CLINICA DI UN FOCOLAIO DI MASTITE OVINA DA <i>STREPTOCOCCUS SUIIS</i> Marogna G., Bacciu D., Salis F., Fiori A., Uzzau S., Schianchi G.	271
PRODUZIONE, USO ED EFFICACIA SUL CAMPO DI UN VACCINO STABULOGENO PER LA PROFILASSI DELLA Piodermite suina da <i>STAPHYLOCOCCUS HYICUS</i> Marogna G., Salis F., Barbato A., Schianchi G.	273

<p>RELAZIONE FRA: VUOTO NECESSARIO ALL'APERTURA DELLO SFINTERE DEL CAPEZZOLO, SEGNI CLINICI MAMMARI ed ESAMI COLTURALI DEL LATTE IN OVINI SARDI</p> <p>Marogna G., Casu S., Pilo C., Sechi S., Tolu S., Saccu C., Carta A., Schianchi G.</p>	275
<p>DETERMINAZIONE RAPIDA CON METODO BIOMOLECOLARE DI BATTERI LATTICI DA LATTE E DERIVATI - RISULTATI PRELIMINARI -</p> <p>Marri N., Carfora V., Patriarca D., Pietrini P., Filippetti F., Giangolini G., Amatiste S.</p>	277
<p>STUDIO DELLE REAZIONI SIEROLOGICHE CROCIATE NELLA DIAGNOSI DI BRUCELLOSI BUFALINA: CONFRONTO TRA BUFALI ESPOSTI A <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i> O:9 E <i>BRUCELLA ABORTUS</i> S19</p> <p>Martucciello A., De Carlo E., Schiavo L., De Donato I., Viscito A., Parente G., Guarino A.</p>	279
<p>APPLICAZIONE DI UN METODO PER L'IDENTIFICAZIONE DELLA PATATA AMFLORA (EH92-527-1) CON L'UTILIZZO DELLA PCR REAL TIME</p> <p>Mascia I., Vodret B., Mancuso M.R., Serratrice G., Oggiano M.A., Marongiu E.</p>	281
<p>SVILUPPO E VALIDAZIONE DI UN METODO DI CONFERMA PER DETERMINAZIONE DI AFLATOSSINA M1 NEL FORMAGGIO MEDIANTE HPLC-FLD</p> <p>Massafra S., Gili M., Ferro G.L., Ostorero F., Olivo F., Abete M.C.</p>	284
<p>ALIMENTI TRASFORMATI DI ORIGINE OVINA: ACQUISIZIONE DI ELEMENTI UTILI PER LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO DA AGENTI BATTERICI DI ZOONOSI E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE</p> <p>Mele P. Rosa MN., Pisanu M., Mula G., Cogoni P., Tola S., Virgilio S.</p>	286
<p>STUDIO PRELIMINARE SULLA PRESENZA DI MICRORGANISMI PATOGENI IN VEGETALI DI I E IV GAMMA</p> <p>Mele P., Assaretti A., Delogu A., Porqueddu G., Rossi M.L., Terrosu G., Fadda A.</p>	289
<p>RING TEST EST 2010: IL FILTRO DELLA NORMA ISO/IEC 17043</p> <p>Meloni D., Manzardo E., Nocilla L., Varello K., Pezzolato M., Mazza M., Ingravalle F., Bozzetta E.</p>	291
<p>TEST RAPIDI BSE: SENSIBILITA' ANALITICA NELLA DIAGNOSI DELLE FORME ATIPICHE</p> <p>Meloni D., Varello K., Pitardi D., Pezzolato M., Casalone C., Balkema-Buschmann A., Groeschup M., Davidse A., Langeveld J.P.M., Cavarretta M.C., Loprevite D., Mazza M., Ingravalle F., Bozzetta E.</p>	293
<p>CONTROLLI DI PROCESSO PRESSO IL LABORATORIO TEST RAPIDI DEL CENTRO DI RIFERENZA NAZIONALE PER LE EST</p> <p>Meloni D., Manzardo E., Cavarretta M.C., Loprevite D., Ingravalle F., Pistone G., Bozzetta E.</p>	295
<p>DIFFERENTI CONDIZIONI DI TRASPORTO NON ALTERANO LE CARATTERISTICHE DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI DI CAVALLO DESTINATE AD IMPIEGO CLINICO.</p> <p>Mercati F., Pascucci L., Ceccarelli P., Dall'Aglio C., Scocco P., Marini C.</p>	297
<p>VALUTAZIONE DI GENI DI RIFERIMENTO PER L'ANALISI DI ESPRESSIONE GENICA TRAMITE REALTIME qPCR IN CELLULE SOMATICHE DEL LATTE DI CAPRA</p> <p>Modesto P., Peletto S., Pisoni G., Cremonesi P., Castiglioni B., Colussi S., Moroni P., Bronzo V., Acutis P.L.</p>	299
<p>INDAGINE SULLA SENSIBILITÀ AGLI ANTIMICROBICI DI CEPPI DI <i>PASTEURELLA MULTOCIDA</i> ISOLATI IN CORSO DI PASTEURELLOSI IN DIVERSE SPECIE ANIMALI</p> <p>Ortenzi R., Cucco L., Mangili P., Cocchi M., D'Angelo G., Sebastiani C., Magistrali C.F.</p>	302

RESPONSABILITA' DEI NEONICOTINOIDI NELLE MORIE DI API IN PROVINCIA DI BIELLA Parisani V., Barbaro A., Vitale N., D'Errico V., Chiavacci L., Rosso A., Brusa B., Palma A., Mogliotti P.	304
STUDIO MORFOLOGICO DI CELLULE STROMALI MESENCHIMALI MULTIPOTENTI (CSM) DA TESSUTO ADIPOSO DI CAVALLO COLTIVATE CON DUE DIVERSI TERRENI Pascucci L., Mercati F., Ceccarelli P., Dall'Aglia C., Marini C.	306
ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI <i>CLOSTRIDIUM DIFFICILE</i> ISOLATI DA MOLLUSCHI EDULI LAMELLIBRANCHI Pasquale V., Romano V., Capuano F., Bove D., Rupnik M., Aliberti F., Guarino A., Porcaro F., Cirillo M., Dumontet S.	308
FORUNCOLOSI IN UN ESEMPLARE DI CARIBE PIRANHA (<i>PYGOCENTRUS CARIBA</i>) STABULATO IN ACQUARIO DOMESTICO: PROVE DI TRATTAMENTO ORALE CONTROLLATO Pavoletti E., Viola E., Arsieni P., Rosso A., Saragaglia C., Mogliotti P., Prearo M.	310
MONITORAGGIO DI MOLLUSCHI EDULI LAMELLIBRANCHI PER LA RICERCA DEL VIRUS DELL'EPATITE E (HEV) Pavoni E., Consoli M., Bertasi B., Saetti F., Ferrari M., Peroni S., Losio M.N.	312
PRODUZIONE DI ENTEROTOSSINE, BIOTIPIZZAZIONE E FINGERPRINTING GENETICO IN <i>S. AUREUS</i> ISOLATO DA CAMPIONI DI FORMAGGIO IN UN SOSPETTO CASO DI MTA. Pedale R., Crisetti E., Addante N., Normanno G., Pedarra C., Montagna C., La Salandra G.	315
VALIDAZIONE DI UN PANNELLO DI GENI DI RIFERIMENTO PER STUDI DI ESPRESSIONE GENICA MEDIANTE REAL-TIME qPCR IN SANGUE INTERO OVINO Peletto S., Bertuzzi S., Campanella C., Modesto P., Maniaci M.G., Bellino C., Ariello D., Quasso A., Caramelli M., Acutis P.L.	317
CROMO: SVILUPPO E VALIDAZIONE DI UN METODO DI ANALISI NEI MANGIMI IN ICP-MS Pellegrino M., Tarasco R., Gavinelli S., Palmegiano P., Brizio P., Leogrande M., Fioravanti F., Squadrone S., Abete M. C.	320
IDENTIFICAZIONE DI PATOGENI IN UN ALLEVAMENTO DI BOVINE DA LATTE MEDIANTE METODO IN MULTIPLEX REAL-TIME PCR Petruzzelli A., Amagliani G., Fogliini M., Oraziotti N., Mancini P., Omiccioli E., Brandi G., Tonucci F.	322
LA RETE DEL CONTROLLO DEI TRATTAMENTI ILLECITI CON METODO ISTOLOGICO: UN SISTEMA AFFIDABILE ED EFFICACE Pezzolato M., Maurella C., Varello K., Richelmi G.B., Maldera O., Mascarino D., Audino V.I., Ingravalle F., Caramelli M., Bozzetta E.	324
VALUTAZIONE DELL'ANTIGENE RICOMBINANTE E2 DEL VIRUS DELLA DIARREA VIRALE BOVINA (BVDV) IN UN SAGGIO SIEROLOGICO ELISA Pezzoni G., Stercoli L., Cordioli P., Brocchi E.	326
LE TECNICHE ALTERNATIVE PER LA RIMOZIONE DEL MATERIALE SPECIFICO A RISCHIO RIDUCONO IL RISCHIO BSE PER L'UOMO Pitardi D., Meloni D., Maurella C., Di Vietro D., Nocilla L., Maldera O., Piscopo A., Pavoletti E., Negro M., Caramelli M., Bozzetta E.	328
STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILLINO RESISTENTE (MRSA) NEL CAVALLO: SEGNALE DI UN CASO PRESSO L'OSPEDALE VETERINARIO DI LODI Pollera C., Ferrucci F., Zucca E., Pozzi F., Cremonesi P., Franco A., Luini M.	330

DIFFUSIONE DELLE VARIANTI DI <i>PARVOVIRUS</i> IN CANI DI ALCUNE PROVINCE DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA E IMPORTATI DALL'EST EUROPA Prati P., Manfredini A., Vicari N., Pongolini S., Petasecca D., Colmegna S., Fabbi M.	332
LE MICOBATTERIOSI ATIPICHE IN FAUNA ITTICA SELVATICA: CONFRONTO IN TRE BIOTOPHI DULCIACQUICOLI DELL'ITALIA SETTENTRIONALE Prearo M., Righetti M., Giorgi I., Arsieni P., Fioravanti M.L., Zanoni R.G., Pavoletti E.	334
MONITORAGGIO DELLO STATO SANITARIO DI ALCUNE PARTITE DI GARRA RUFA DA UTILIZZARSI IN CENTRI ESTETICI DELLA PROVINCIA DI TORINO (PIEMONTE, ITALIA) Prearo M., Arsieni P., De Vita V., Righetti M., Di Donfrancesco B., Amato G., Pavoletti E.	336
DESCRIZIONE DI UN CASO DI PLASMOCITOMA EXTRAMIDOLLARE IN UN GATTO Puleio R., Tamburello A., Di Caccamo C., Loria G. R.	338
IMPIEGO SPERIMENTALE DI UN VACCINO A DNA NEL CONTROLLO DEL CARCINOMA MAMMARIO DEL CANE Puleio R., Tamburello A., Amici A., Cavallo F., Vazzana I., Loria G.R., Di Marco V.	340
STUDIO DEI MARCATORI GENETICI NEL GENOMA DELLA POPOLAZIONE BOVINA SICILIANA Reale S., Lupo T., Ciprì V., Gargano V., Piazza M., Migliazzo A., Vitale F.	342
IMPORTANZA DELL'IMPIEGO IN SERIE DI DIFFERENTI METODI SIEROLOGICI NELL'AMBITO DEL PIANO DI SORVEGLIANZA E PER LA CONFERMA DELL'ANEMIA INFETTIVA EQUINA Ricci I., Forletta R., Gasperetti L., Caciolo D., Sabatini S., Scicluna M.T., Autorino G.L.	344
CONSIDERAZIONI SUL TREND DEI RISULTATI DEI CIRCUITI INTERLABORATORIO PER LA DIAGNOSI DI ANEMIA INFETTIVA DEGLI EQUINI CONDOTTI NEL CORSO DEGLI ULTIMI 9 ANNI Ricci I., Gasperetti L., D'Alonzo A., Nardini R., Giusti C., Forletta R.	346
SU DI UN EPISODIO DI RED MARK SYNDROME IN TROTA IRIDEA (<i>ONCORHYNCHUS MYKISS</i>) IN PIEMONTE: DESCRIZIONE DEL QUADRO ANATOMOPATOLOGICO ED ISTOLOGICO Righetti M., Bozzetta E., Pezzolato M., Arsieni P., Varello K., Saragaglia C., Di Donfrancesco B., Pavoletti E., Prearo M.	348
ANALISI FILOGENETICA DI <i>AVIPOXVIRUS</i> ISOLATI IN PIEMONTE, LIGURIA E VALLE D'AOSTA A PARTIRE DAL 2006 Rizzo F., Potenza M., Belvedere M., Ameri D., Bianchi C., Robetto S., Peletto S., Orusa R., Mandola M.L.	350
ESPRESSIONE DELLA GP51 INTERA E MUTATA DEL VIRUS DELLA LEUCOSI ENZOOTICA BOVINA IN CELLULE DI MAMMIFERO E VALUTAZIONE DI UN SUO IMPIEGO IN ELISA Rizzo G., Forti K., Cagiola M., Feliziani F., Ferrante G., De Giuseppe A.	352
RISULTATI PRELIMINARI DELLA RICERCA DI <i>LEISHMANIA</i> NELLE VOLPI IN PIEMONTE TRAMITE REAL TIME PCR, NEL CONTESTO DEL NUOVO PIANO REGIONALE SELVATICI. Romano A., Radaelli M.C., Chiavacci L., Delvento P., Maurella C., Vitale F., Dondo A., Gorla M.	354
SVILUPPO DI UNA MULTIPLEX REAL TIME PCR PER LA IDENTIFICAZIONE E LA DIFFERENZIAZIONE DEL BVDV TIPO 1, 2 E 3. Rossi E., Casciari C., Torresi C., Giammarioli M., De Mia G.M.	356

<p><i>MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP. AVIUM</i> IN UN ALLEVAMENTO SUINO: DIAGNOSI E CONSIDERAZIONI PRELIMINARI SU POSSIBILI FONTI DI INFEZIONE</p> <p>Rossi F., Zoppi S., Garrone A., Gorla M., Varello K., Dondo A.</p>	358
<p>CONTROLLI SECONDO IL REG. CE 2073/05 E SS.MM.II. SU MOLLUSCHI BIVALVI VIVI, ECHINODERMI, TUNICATI E GASTEROPODI VIVI IN REGIONE PIEMONTE (2009-2010)</p> <p>Rubinetti F., Decastelli L., Galleggiante Crisafulli A., Gallina S., Bianchi DM, Chiavacci L., Barbaro A.</p>	360
<p>DIAGNOSI DI MASTITE BOVINA MEDIANTE TERRENO CROMOGENO</p> <p>Sagrafoli D., Giacinti G., Tammaro A., Pietrini P., Patriarca D., Zucchitta P., Bovi E., Rosa G.</p>	362
<p>FUNZIONALITA' EPATICA, RENALE E DEL SISTEMA IMMUNITARIO IN BROILER ALIMENTATI CON UNA DIETA CONTAMINATA CON 0,1 mg/kg DI OCRA TOSSINA A</p> <p>Salamano G., Mellia E., Pozzo L., Schiavone A., Tarantola M., Gennero M.S., Doglione L.</p>	364
<p>IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI CEPPI DI <i>ESCHERICHIA COLI</i> PRODUTTORI DI β-LATTAMASI ISOLATI DA CANI E GATTI CON CISTITE NELLA PROVINCIA DI TORINO</p> <p>Salvarani S., Tramuta C., Nebbia P., Robino P.</p>	366
<p>INDAGINE DI BENESSERE ORGANIZZATIVO: STRUMENTO DI CAMBIAMENTO</p> <p>Sarrecchia E., Bozzano A.I.</p>	368
<p>CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI <i>PASTEURELLA MULTOCIDA</i> ISOLATI IN CORSO DI PASTEURELLOSI DA DIVERSE SPECIE ANIMALI</p> <p>Sebastiani C., Ortenzi R., Biagetti M., Mangili P., Bano L., Luppi A., Cucco L., Magistrati C.F.</p>	370
<p>UTILIZZO DI TECNICHE MORFOLOGICHE E DI BIOLOGIA MOLECOLARE PER L'IDENTIFICAZIONE DI <i>ANISAKIS</i> SPP. IN SPECIE ITTICHE DI INTERESSE COMMERCIALE: DATI PRELIMINARI</p> <p>Serracca L., Prearo M., Cencetti E., Pavoletti E., Fioravanti M.L., Righetti M., Di Donfrancesco B., Battistini R., Rossini I., Ercolini C.</p>	372
<p>IDENTIFICAZIONE DEI PRINCIPALI PATOGENI ALIMENTARI TRAMITE REAL TIME PCR</p> <p>Simula G., Perria F., Savoldi Boles M.</p>	374
<p>VALUTAZIONE DEI CAMPIONI POSITIVI PER CORTISONICI SU MATRICE URINA NELLA REGIONE PIEMONTE</p> <p>Sperone V., Capra P., Ciccotelli V., Brizio P., Leporati M., Rosso C., Meinero P., Pistone G.C., Abete M.C., Gili M.</p>	376
<p>RICERCA DIRETTA DI PARASSITI GASTROINTESTINALI: DUE METODI A CONFRONTO</p> <p>Torina A., Galuppo L., Martorana C., Migliazzo A., Pisano P., Licitra F., Francaviglia F., Caracappa S.</p>	378
<p>DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DELL'ALBUMINA NEL LATTE IN BOVINE DI RAZZA PEZZATA ROSSA</p> <p>Trimboli F., Siclari E., Procopio A., Poerio A., Britti D.</p>	380
<p>VALUTAZIONE DELLE PERFORMANCE DIAGNOSTICHE DI UN SISTEMA MICROARRAY PER L'IDENTIFICAZIONE DELLE SPECIE ZOOLOGICHE IN ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE</p> <p>Varcasia B.M., De Santis P., Bilei S.</p>	382

UTILIZZO DEL METODO MICROARRAY PER L'IDENTIFICAZIONE DELLE SPECIE ZO- OLOGICHE NEI KEBAB Varcasia B.M., Cesarano D., Scaramella L., Bilei S., De Santis P.	385
VALUTAZIONE DEI 7 ANNI DI ATTIVITA' DEL PIANO DI CONTROLLO IBR IN PIEMONTE Vitale N., Massa M., Masoero L., Possidente R., Rosso F., Crisafulli A., Travaglio S., Chiavacci L.	387
VALUTAZIONE DEL RISCHIO DA RADIAZIONI OTTICHE ARTIFICIALI (ROA) Vitelli B. R., Sini S., Saezza M. E., Cenci F., Severini S.	389
STRESS OSSIDATIVO E ONCOLOGIA COMPARATA: ANALISI PRELIMINARE DI MAR- CATORI SPECIFICI IN ANIMALI DOMESTICI Vito G. Bassi A.M., Scanarotti C., Brambilla G., Schiavetti I., Turno P., Gotelli S., Ratto A., Cam- panella C., Cosma V., Ferrari A.	391
RICERCA DI ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI NEGLI ALIMENTI E MAN- GIMI COMMERCIALIZZATI IN SARDEGNA: RISULTATI E CONSIDERAZIONI Vodret B., Mancuso M.R., Serratrice G., Oggiano M.A, Mascia I., Marongiu E.	393
CASE REPORT SU UN GRAVE FOCOLAIO DI MASTITE DA MYCOPLASMA BOVIS Zanardi G., Sorgia E., Bolzoni G., Rosignoli C., Bertocchi L.	395
INDICE DEGLI AUTORI	399

**Lecture plenary,
oral communications**

LE COMPETENZE COMUNICATIVO-RELAZIONALI NELLA PROFESSIONE

DOTT. NICOLA DONTI

*“Ciò che alla fine va ristretto
Deve prima essere esteso
Ciò che va indebolito
Deve all'inizio essere rafforzato
Ciò che va rovesciato
Deve all'inizio essere drizzato
Colui che vuol prendere
Deve cominciare a dare”*

Lao Tzu, Tao Te Ching

Freud sosteneva che tre cose sono impossibili: insegnare, guarire, governare. A pensarci bene ognuna di queste fa parte delle “professioni sanitarie”, vediamo perché:

1. Insegnare. Nei compiti che ogni giorno ci troviamo a svolgere è inevitabile che il nostro modo di comportarci, di operare, di essere scrupolosi nel lavoro, puntuali nelle scadenze o nel raggiungere gli obiettivi, costituisce un esempio per tutte le persone che lavorano con noi. Gli altri, a loro volta possono essere per noi un buono o cattivo esempio. Questo significa che, nostro malgrado, siamo tutti maestri ed allievi e la cosa importante è accorgersene per capire in che modo si possa diventare dei buoni esempi ed in questo modo anche dei buoni insegnanti.

2. Guarire. Per tutti quelli che si occupano di “salute” nel senso più ampio del termine vale l'adagio del XIV secolo: “Curare spesso, guarire qualche volta, consolare sempre”. Ognuno si sarà reso conto di come il proprio lavoro, pur avendo sulla carta ben altre ambizioni, finisca poi per doversi accontentare di successi molto più relativi. Ammesso che, superando i deliri di onnipotenza suggeriti ed a volte imposti dallo scientismo tecnocratico, non si scoprano nuove e maggiori possibilità.

3. Governare. Nelle attività quotidiane, a meno che non si lavori in perfetta solitudine, condizione assai improbabile in tempi di sinergie e di globalizzazione, siamo immersi in una fitta rete di relazioni ed abbiamo continui scambi con gli altri. Governare, appunto, queste diverse anime che intervengono nella gestione dei processi è una delle qualità che risultano utili per raggiungere i risultati. Per non parlare poi di chi nell'azienda, sia pubblica che privata, si trova ad esercitare un ruolo e a svolgere una funzione di leadership, che ha come caratteristica il governo delle difficili dinamiche dei gruppi.

Indubbiamente occorre una certa vocazione per affrontare questi compiti ‘impossibili’ e molti credono di potersi improvvisare avanzando per prove ed errori nella difficile palestra del lavoro quotidiano.

Sarebbe opportuno anche disporre di ‘arti’ o ‘tecniche’ per farlo in modo responsabile poichè c'è il rischio che divenga puro diletterismo, allorchè non si fonda sulla conoscenza della realtà in cui viviamo.

Un valido esempio, ovvero un buon maestro, in questo senso è Taijchi Ohno, il padre della filosofia giapponese di management conosciuta con il nome di JIT, “Just in time”, ed applicata con successo sin dal lontano 1970 in parecchie organizzazioni produttive giapponesi. Egli ha, dapprima, sviluppato ed ottimizzato la JIT negli stabilimenti della Toyota,

come mezzo per soddisfare la domanda dei consumatori, con il minimo ritardo. Ben presto tale strumento da semplice mezzo si è cominciato a trasformare, arricchendosi di nuovi e sempre più ampi contenuti diventando piuttosto una vera e propria filosofia. Il nucleo centrale di questa “filosofia” è sintetizzata in una frase dello stesso Taijchi Ohno “Le risorse umane sono qualcosa al di sopra di ogni misurazione. Le capacità di queste risorse possono estendersi illimitatamente quando ogni persona comincia a pensare”

Eppure qualcuno ha provato, se non a misurare, quanto meno a riconoscere delle percentuali, ovvero il peso che le risorse umane hanno all'interno di un'organizzazione più o meno complessa. Da uno studio scandinavo, infatti, è emerso che nella sanità la componente materiale, tangibile, rappresenta solo il 15% dell'intero patrimonio aziendale (G. P. Bonani 2002) mentre la componente non materiale, intangibile, ne rappresenta l'85%. Non resta che ammettere che il bilancio contabile non è rappresentativo del reale valore delle aziende di servizi. Il reale valore di un'azienda è formato dalle risorse intangibili, ovvero da tutti quei fattori, non strettamente economici, capaci però di generare un enorme potenziale di valore. Quei fattori sono i talenti, il know how e le conoscenze dei professionisti, l'efficienza dei sistemi di gestione e di sviluppo, la qualità delle relazioni con gli utenti e i clienti interni ed esterni, il tipo di cultura aziendale e manageriale, la capacità d'innovazione, la capacità di valorizzare le risorse umane e la capacità di capitalizzare il patrimonio più prezioso, quello della conoscenza.

Quindi, in un'azienda, una delle modalità di creazione del valore intangibile è quello delle relazioni, poichè è poco probabile che un operatore riesca ad avere un giusto orientamento interpersonale verso l'utente, laddove, nel contesto organizzativo aziendale, esistano incomprensioni, conflitti, ambivalenze, competizioni tra gli operatori, tra i dirigenti e gli operatori. È risaputo che le azioni organizzative orientate verso lo sviluppo degli stili relazionali “dell'appartenenza” e della “fidelizzazione” degli operatori sono una componente fondamentale nel processo di creazione del valore. Non a caso, il management delle aziende che riesce a capitalizzare la soddisfazione e la fedeltà del proprio personale, raggiunge con più facilità elevati livelli di qualità del servizio e più bassi livelli di costo (Cantone L.A.N. 1996). Quale tipo di qualità del servizio, difatti, potrà mai essere rilevata in una struttura dove il burnout è diffuso tra gli operatori? Eppure questo dato è sistematicamente escluso dai rapporti che conducono alle certificazioni. Come se, ciò che accade agli operatori, non

avesse alcuna ripercussione nella relazione con gli utenti (V. Masini 2005). Il primo vero confronto di "mercato" per un'azienda è quindi con il suo personale interno, prima ancora che con il suo utente, cliente esterno: creando fiducia e favorendo la partecipazione e il coinvolgimento è possibile aumentare il livello di soddisfazione lavorativa del cliente interno e, ciò, conseguentemente, fa aumentare il livello di soddisfazione dei clienti esterni.

In altre parole cosa c'è alla base di tutte le organizzazioni? Sicuramente le persone, vale a dire il capitale umano, costituito dall'insieme delle capacità, delle competenze, delle motivazioni e dello spirito d'iniziativa che rappresentano il requisito necessario per la realizzazione e lo sviluppo di un'azienda (F. D'Egidio 2004).

Tuttavia, le persone, da sole, non sono sufficienti. Per creare un gruppo di lavoro che non sia solo la somma delle specialità e delle competenze di ciascuno, occorre che le persone costruiscano una serie di relazioni-interazioni e di legami basati sulla fiducia e sul riconoscimento reciproco: vale a dire il capitale relazionale che dipende dalla qualità delle relazioni che le persone sono state in grado di realizzare. Nonostante questo dato sia considerato ampiamente acquisito, ancor oggi parlare di simili argomenti viene letto come inutile astrazione dai problemi reali, insomma come parlare di "aria fritta". Eppure la comunicazione efficace è valutato elemento indispensabile per la promozione della salute e per lo sviluppo di una migliore qualità della vita tanto degli operatori quanto dei cittadini, poichè facilita una comprensione più profonda di sé e degli altri sviluppando attitudine empatica e capacità di rapporto. Eppure i corsi di formazione che hanno come tema la comunicazione vengono considerati del tutto accessori e non determinanti per l'esercizio della professione, come se non fosse necessario che un buon veterinario, ad esempio, sappia comunicare in modo efficace con la popolazione piuttosto che con i propri colleghi e collaboratori. Una sorta di sufficienza, quando non vero e proprio ostracismo, nei confronti dei temi quali la gestione delle risorse umane, delle dinamiche di gruppo, ecc., che finisce per relegare la figura del buon professionista ad un semplice buon tecnico.

In questo modo si finisce per creare un pericoloso paradosso di cui siamo testimoni in questi anni: mentre si spinge verso una sempre maggiore competenza dei professionisti, tali competenze sono sempre più tecniche, specialistiche e settoriali, con il risultato di isolare e rendere sempre più difficili le relazioni sia tra diverse specializzazioni oltre che con la popolazione. Ho detto che si tratta di un paradosso perché con l'intento di raggiungere risultati sempre migliori si finisce per ottenere una iper-specializzazione che rischia di compromettere proprio due elementi fondamentali della ricerca scientifica:

1. il contatto con la realtà e il mondo che ci circonda
2. l'elemento più importante che sottostà ad ogni scoperta scientifica, ovvero la capacità di stabilire nuovi collegamenti.

In particolare rispetto al punto 1. Il ruolo dello scienziato assomiglia a quello che anticamente svolgevano i sacerdoti. Gli scienziati sono oggi legittimati a interpretare il mondo grazie alla rispettabilità, all'immagine positiva della loro strumentazione logica e al ruolo autorevole e super partes e non in virtù della evidenza delle argomentazioni o alla reale capacità di risolvere i problemi. Dall'epoca del positivismo trionfante, la "sacralità" della scienza ha subito gravi colpi. Da questo punto di vista, una svolta di grande impatto emotivo è rappresentata dalla seconda guerra mondiale.

Oggi, sebbene la "fiducia sociale" nella scienza sia ancora diffusa, il suo prestigio appare molto ridimensionato rispetto al passato e lo statuto epistemologico di molte discipline inizia pericolosamente a vacillare. La proliferazione attuale di idee, teorie, paradigmi e "scuole" (spesso contrapposte) ha compromesso il mito della scienza come sistema depositario di "verità assolute". La moltiplicazione delle verità scientifiche produce un effetto di spaesamento sui singoli e sulla collettività, rafforzando l'adesione "fideistica" a una tesi piuttosto che a un'altra. La divulgazione scientifica operata dai media produce una specie di imbuto, che lascia filtrare solo gli elementi più semplici e comprensibili, perdendo progressivamente ricchezza e complessità. Le idee semplici, o semplificate al di là di quanto possano esserlo, appaiono comode perchè non danno problemi, perchè si depositano tranquillamente nella fanghiglia in fondo alla mente, dopo aver dissolto ogni tensione e ogni complicazione, nonostante l'avvertimento di Einstein: "tutto dovrebbe essere semplice come può esserlo, ma non di più...". Gli stessi ambienti scientifici si caratterizzano per una crescente incertezza e per la distanza e l'incompatibilità fra le diverse linee teoriche. Le contrapposizioni nei dibattiti generano accuse reciproche, avallando le interpretazioni delle rispettive posizioni in termini di difetti caratteriali o di pregiudizi personali. La riflessione su "deviazioni" e "deriva tecnocratica" propone infine una nuova idea di scienza, fondata sulla debolezza e sull'umiltà, sull'accettazione dell'incertezza e della complessità come dati strutturali del sapere contemporaneo e sulla rinuncia alla ricerca di certezze e verità assolute.

Veniamo quindi al punto 2. A. Einstein amava ripetere che "nessun problema può essere risolto dallo stesso pensiero che lo ha generato", le soluzioni appartengono al nuovo e la novità risiede nel diverso, ovvero in chi non la pensa come noi. È in quest'ottica che la frase di A. Plebe assume un significato straordinario: "la consapevolezza dei limiti di una disciplina la rende ancora più cara a chi la coltiva con passione e non con fanatismo". L'iperspecializzazione rischia di diventare un pericoloso ostacolo al lavoro in equipe, soprattutto laddove si parla di equipe multidisciplinari. Così uno studio isolato, non condiviso, come quello eccessivamente accademico, ha in sé un forte pericolo: isola le persone, come isola le materie (iperspecialismo), le mette in competizione, genera paura e quindi alimenta bisogno di acquisire potere, mancando la visione d'insieme. Ne scaturisce l'importanza fondamentale del dialogo, attraverso il quale un gruppo cresce proporzionalmente alla sua capacità di collaborare, aprendosi ai diversi punti di vista. Lo scopo del dialogo è andare oltre la comprensione di ogni singolo individuo, per questo nel dialogo non si cercherà di vincere l'uno sull'altro (discussione), ma la possibilità di vincere tutti, grazie alla collaborazione. Heisenberg, il fisico che ha formulato il noto principio d'indeterminazione, sosteneva che "la scienza è radicata nelle conversazioni". Egli ricorda una vita di conversazioni con Pauli, Einstein, Bohr, che hanno prodotto risultati scientifici di eccezionale importanza, confermando che l'intelligenza di un gruppo che dialoga può essere molto più grande di quella dei singoli individui. Tali presupposti implicano che, ad ogni passo, noi valutiamo se stiamo agendo in uno stato di "connessione" e di condivisione o in uno stato di separazione e "paura". "Ogni volta che alimentiamo stati di paura, qualunque appaiano i risultati esteriori a breve termine, siamo fuori dal cammino evolutivo. Il nostro pensiero, non importa quanto complesso e sofisticato, non può essere creativo e produttivo. Non può risolvere problemi,

ma solo generarli e alimentarli. Quando siamo isolati e scissi, perdiamo contatto con le forme d'intelligenza più grandi che permeano l'universo" (M. Scardovelli).

Lo scrittore e filosofo statunitense E. Hoffer disse che "in un' era di cambiamenti, colui che impara eredita il mondo. Colui che già sa è perfettamente equipaggiato per un mondo che non esiste più". Mai come oggi siamo testimoni di un'epoca che cambia alla velocità della luce, in cui la scienza progredisce sempre più rapidamente. La rivoluzione iniziata da Internet contribuisce a cambiamenti politici che fino a ieri sembravano impossibili. Oggi più che mai siamo in quella che, non a caso, è stata definita l'era della comunicazione. Eppure ancora facciamo fatica a riconoscere l'importanza di questo straordinario strumento, probabilmente perché, più o meno consapevolmente, sappiamo che per poterlo maneggiare occorre un allenamento particolare: bisogna praticare l'umiltà. L'umiltà di riconoscere nell'altro non un pericolo ma una risorsa, l'umiltà di accettare che la propria materia rappresenta solo uno dei tanti punti di vista e non il punto di vista, l'umiltà di capire che è molto più importante farsi capire che parlare, in breve l'umiltà di imparare sempre. Quest'ultima è, forse, la

ragione per cui è tanto difficile comunicare, perché l'ascolto è il pilastro su cui poggia ogni discorso sulla comunicazione e a cui giungono tutte le teorie su questo argomento. Per questo è sempre stato facile parlare e molto più difficile comunicare, perché per parlare non serve l'umiltà di cui abbiamo detto e sembra sia sufficiente dire prescindendo da chi si ha di fronte e, soprattutto, ignorare l'effetto che le nostre parole possano avere.

Alla luce di quanto detto sin qui si può meglio comprendere la durissima affermazione di Freud con cui è cominciata la presente trattazione, ovvero che tre cose sono impossibili: insegnare, guarire, governare. Infatti, risulta plausibile che con questa dichiarazione egli volesse sottolineare quanto potesse essere arduo il cammino che attende chiunque voglia apprendere la difficile arte del comunicatore. Dico questo perché alla base di tutte e tre le attività indicate da Freud è facile rintracciare proprio la competenza comunicativa e dobbiamo ammettere che comunicare è se non impossibile, molto più difficile di quanto si possa credere, visto che l'umiltà, che presiede ad ogni atto comunicativo, è virtù assai difficile da apprendere.

APPLICAZIONE DEL DR-CALUX® QUALE METODO DI SCREENING: CONFRONTO DEI DATI OTTENUTI CON IL METODO DI RIFERIMENTO HRGC-HRMS

¹Bertasi B., ¹Maccabiani G., ¹Fusini F., ¹Tilola M., ²Gasparini M., ³Nassuato C., ²Ferretti E., ¹Losio M. N.

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Reparto Tecnologia Acidi Nucleici applicata agli alimenti, Brescia

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Reparto Chimica degli Alimenti di Origine Animale, Brescia

³Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sorveglianza Epidemiologica della Lombardia, Brescia

Key words: diossine, uova, DR-calux, gas massa

SUMMARY

Polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans (PCDD/Fs) and biphenyls (dl-PCBs) are ubiquitous environmental contaminants; because their high stability they are not decomposed and show a strong tendency to biomagnification in animal and human tissues, accumulating in the whole food chain. We decided to study eggs from laying chicken in contaminated areas because in these last years consumers favour "natural" and not-treated food. It was applied as screening test, the DR CALUX® bioassay. We revealed in general an overestimation by screening related to confirmation.

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni il mercato dei prodotti biologici e "salutistici" ha registrato un forte incremento, con sempre più persone che preferiscono tali prodotti a quelli tradizionali o della grande distribuzione. Di conseguenza sono necessari, da parte della Autorità competenti, maggiori controlli verso questi prodotti per garantire e tutelare i consumatori. Un esempio di queste nuove abitudini alimentari è il consumo di uova prodotte da galline in allevamenti estensivi piuttosto che intensivi. La sicurezza alimentare viene garantita sottoponendole a due tipologie di controlli: analisi microbiologiche e ricerca di contaminanti chimici. Tra questi sono di particolare rilievo composti chimici aromatici policlorurati comunemente definiti "diossine" e divisi in due famiglie: dibenzo-p-diossine (PCDD o propriamente "diossine") e dibenzo-p-furani (PCDF o furani). Si tratta di idrocarburi aromatici clorurati particolarmente stabili e persistenti nell'ambiente, tossici per l'uomo, gli animali e l'ambiente stesso. Possono originarsi da processi chimici di sintesi di composti clorurati o da processi di combustione che coinvolgono prodotti quali materie plastiche, termoplastiche, termoisolanti ecc. Se rilasciati nell'ambiente possono depositarsi sul suolo e sulle parti arboree delle piante (6). Le diossine rappresentano, quindi, contaminanti ambientali ubiquitari. Grazie alla loro persistenza e potenziale bioaccumulo nei tessuti grassi degli animali e nelle piante, sono in grado di diffondersi in tutto l'ecosistema. La ricerca di diossine negli alimenti è molto importante in quanto essi rappresentano la principale fonte di assunzione di questi composti da parte dell'uomo; le uova, contenendo almeno il 10% di grasso, risultano essere un favorevole deposito grazie alla caratteristica di liposolubilità di questi composti. Si stima che il contributo delle uova nell'assunzione totale di diossine dagli alimenti corrisponda ad un range che va dal 2 all' 8%. (4)

Sono stati svolti diversi studi volti a capire come possa avvenire la contaminazione delle uova ed è emerso che i livelli di PCDD/F nelle uova sembrerebbero correlati al tipo di allevamento (anche se il discorso risulta in realtà molto complesso e molteplici sono i fattori che debbono essere valutati per elaborare delle conclusioni): le uova prodotte da galline allevate a terra presentano in generale valori più elevati rispetto a quelle prodotte da galline allevate in gabbia. (3) In particolare il suolo è risultato essere la principale fonte di contaminazione da PCDD/F, per quanto concerne l'allevamento outdoor, questo perché i polli ingeriscono una certa

quantità di terreno e sabbia per favorire la digestione. (2)

L'utilizzo dei sistemi di *screening* rende possibile effettuare indagini su larga scala, indispensabili ai fini epidemiologici. Nel Regolamento 1831/2003/CE (1), che sancisce la possibilità di utilizzo di questi metodi, vengono anche descritti i criteri di accettabilità dei test: essi devono presentare falsi negativi inferiori all'1% e precisione inferiore al 30%. Nonostante gli indubbi vantaggi che può comportare l'utilizzo di un sistema di screening, tali metodiche non sono ancora molto diffuse sul territorio.

L'obiettivo di questo lavoro è quello di confrontare i dati ottenuti dal metodo di *screening* "DR CALUX® bioassay" con quelli ottenuti dal metodo di conferma, la gas massa HRGC-HRMS (high-resolution gas chromatography-high-resolution mass), per verificare la percentuale di falsi positivi e negativi, importante al fine del potenziale utilizzo su larga scala del test.

MATERIALI E METODI

Sono state analizzate 50 uova prelevate da allevamenti a terra ed analizzate con la metodica DR-CALUX®. Il campione viene preparato mediante estrazione chimica cui segue la determinazione delle diossine mediante l'utilizzo della linea cellulare di epatoma di ratto H4IIE (fornita dal laboratorio BioDetection Systems - Amsterdam): l'estratto viene messo a contatto con la coltura cellulare che viene stimolata a produrre luciferasi in modo proporzionale al contenuto di diossine e PCB diossina simili del campione. La diossina eventualmente presente viene quantificata comparando l'attività della luciferasi rispetto a standard a concentrazione nota. Il risultato viene espresso in pg TEQ su g di grasso. Il TEQ rappresenta la tossicità equivalente della miscela PCDD/F e PCB riferita alla diossina 2,3,7,8 TCDD (la più tossica) ed è data dal prodotto tra la concentrazione delle sostanze costituenti la miscela PCDD/F ed i rispettivi TEF (fattore di tossicità equivalente stabilito da WHO per ciascuna sostanza). (5)

Il metodo di conferma utilizzato è HRGC-HRMS. Questo metodo prevede che, in seguito a liofilizzazione, il campione venga estratto attraverso un solvente organico (toluene). L'estratto viene purificato mediante l'utilizzo di una colonna di silica acidificata cui segue un secondo step mediante Power Prep. Gli analiti sono quantificati con Autospec (Waters) collegato ad un gas cromatografo (Agilent 6890 Series). Ciascun campione è stato analizzato in triplicato.

I risultati ottenuti con entrambe le metodiche sono stati confrontati mediante test statistici per verificare la significatività delle differenze.

Per poter constatare anche a livello sperimentale se i risultati ottenuti dai campioni di campo dipendessero direttamente da una composizione diversificata della miscela contaminante (differenti rapporti PCB-diossine) e se fossero presenti fenomeni sinergici fra i diversi composti aromatici, sono state eseguite prove di contaminazione artificiale su coltura cellulare. In particolare sono state preparate curve standard di 2,3,7,8 TCDD e di PCB 126 (concentrazioni 0 – 0,3 – 0,6 – 1 – 2 – 3 pM) e miscele contenenti

diverse concentrazioni di PCB 126 e diossine. In seguito sono stati messi a confronto i risultati ottenuti dai campioni di campo con quelli emersi dalle prove sperimentali.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati mostrati in tabella 2 mostrano che tutti i campioni di uova analizzati presentano un valore di TEQ/g grasso superiore al limite di legge.

Dal confronto di questi dati, ottenuti mediante DR-CALUX®, con quelli del metodo di conferma è stato possibile notare, tranne che in pochi casi, una generale sovrastima del sistema di screening rispetto all'HRGC-HRMS (tabella 2) e la presenza di soli 3 falsi positivi su 33 campioni (9%). La tipologia dei dati in possesso non ha permesso però di valutare la significatività delle differenze fra gas massa e calux in quanto i dati presentavano varianza non omogenea, escludendo la possibilità di applicare test statistici di confronto. Tale sovrastima tuttavia giustifica e valorizza il metodo DR-CALUX® come strumento di *screening* per la presenza di diossine nelle uova, in quanto riduce al minimo l'eventualità di rilevare falsi negativi. Data questa premessa è nata la necessità di verificare a livello sperimentale la sovrastima osservata, basandosi sulla produzione di miscele utilizzate per le contaminazioni sperimentali.

Le curve standard di PCB e diossina ottenute in condizioni controllate hanno mostrato un andamento quasi sovrapponibile; sembra che entrambi i composti inducano la produzione di luciferasi in maniera molto simile.

Successivamente è stato valutato se diossine e PCB possano avere un effetto sinergico nella determinazione della tossicità cellulare (tabella 1).

Tabella n.1 Risultati ottenuti dalla miscela di 2,3,7,8 TCDD e PCB 126, analizzate con il metodo DR-CALUX®

pM attesi	Ratio TCDD/PCB 126	pM osservati
0.3	1:1	0.47
0.45	1:2	0.67
0.45	2:1	0.70
0.6	1:1	0.83
0.65	1:3	0.77
0.65	3:1	0.83
1	1:1	1.20
1.3	1:3	1.77
1.3	3:1	1.57
2	1:1	2.40
2.5	1:4	2.70
2.5	4:1	3.23
3	1:1	3.13
3.5	6:1	3.43
3.5	1:6	3.33

Il t-test applicato per valutare la significatività delle differenze ottenute fra valore di contaminazione atteso/osservato ha dimostrato che queste sono statisticamente significative. L'elaborazione in questo caso dovrebbe comunque tenere conto del fatto che la valutazione e la produzione dei dati sono state fatte in condizioni omogenee e strettamente controllate, condizione che è difficile da riprodurre in situazioni reali.

A seguito di quanto osservato è molto importante sottolineare che non sono presenti falsi negativi e che quindi il test di *screening* rientra in quelle che sono le specifiche di legge limitanti per l'applicazione di queste metodiche (direttiva 2002/69/EC); perciò i dati ottenuti confermano che il test può essere considerato idoneo per l'utilizzo in campo pratico.

Le valutazioni effettuate fino a questo momento potrebbero però essere viziate da un numero non sufficiente di campioni; si rende di conseguenza necessario un ampliamento del pannello di

campioni per effettuare confronti più accurati tra le due metodiche, in modo tale da confermare (o smentire) la validità del metodo come *screening* e poi permettere una stima più precisa dei falsi positivi, che, se numerosi, potrebbero impattare sul rapporto costi benefici dello *screening*.

Tabella n.2 Risultati ottenuti da DR-CALUX® e HRGC/HRMS. Calcolo dei falsi positivi con differente cut-off.

EGG SAMPLES					
EU limit (pg TEQ/fat)	DR CALUX (pg TEQ/g fat)	HRGC/HRMS (pg TEQ/g fat)	Cut-Off DR CALUX = Total-TEQ minus 50%	Cut-Off DR CALUX = Total-TEQ minus 25%	Cut-Off DR CALUX = Total-TEQ minus 2/3
6	2.4	5.5	3.0	4.5	4
6	9.1	6.1	3.0	4.5	4
6	23.0	89.6	3.0	4.5	4
6	9.3	13.6	3.0	4.5	4
6	14.5	35.8	3.0	4.5	4
6	29.0	35.1	3.0	4.5	4
6	16.0	10.2	3.0	4.5	4
6	14.0	7.4	3.0	4.5	4
6	11.0	6.9	3.0	4.5	4
6	26.0	26.2	3.0	4.5	4
6	10.0	7.6	3.0	4.5	4
6	18.0	15.9	3.0	4.5	4
6	12.0	12.7	3.0	4.5	4
6	12.0	9.0	3.0	4.5	4
6	12.0	7.6	3.0	4.5	4
6	6.6	3.3	3.0	4.5 (false positive)	4 (false positive)
6	20.0	22.6	3.0	4.5	4
6	13.0	10.4	3.0	4.5	4
6	15.0	14.2	3.0	4.5	4
6	9.8	3.2	3.0	4.5 (false positive)	4 (false positive)
6	7.0	5.9	3.0	4.5	4
6	8.7	5.0	3.0	4.5	4
6	11.0	9.8	3.0	4.5	4
6	7.6	6.1	3.0	4.5	4
6	7.1	2.7	3.0 (false positive)	4.5 (false positive)	4 (false positive)
6	12.0	8.2	3.0	4.5	4
6	9.5	5.0	3.0	4.5	4
6	35.0	61.7	3.0	4.5	4
6	11.0	9.2	3.0	4.5	4
6	15.0	18.7	3.0	4.5	4
6	27.0	38.0	3.0	4.5	4
6	8.2	6.0	3.0	4.5	4
6	18.0	15.5	3.0	4.5	4

BIBLIOGRAFIA

1. Commission Regulation (EC), 19 December 2006, laying down methods of sampling and analysis for the official control of levels of dioxins and dioxin-like PCBs in certain foodstuffs. Official journal of European Community 20/12/2006 – L364/32
2. Fernandes A.R., Foxal C., Lovett A., Rose M., Dowing A. The assimilation of dioxin and PCBs in conventionally reared farm animals: occurrence and biotransfer factors. *Chemosphere* Vol. 83 pp. 815-822, 2011
3. Fürst P., Fürst C., Wilmers K. PCDD/PCDF in commercial chicken eggs- dependence on the type of housing, *Proceedings of Dioxine '93*, Vol 13, pp31-34
4. Menotta S., D'Antonio M., Diegoli G., Montella L., Raccanelli S., Fedrizzi G. Depletion study of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs concentrations in contaminated home-produced eggs: preliminary study. *Analytica Chimica Acta* Vol. 672 pp. 50-54, 2010
5. Van den Berg M., Birnbaum L. S., Denison M., De Vito M., Farland W., Feeley M., Fiedler H., Hakansson H., Handberg A., Haws L., Rose M., Safe S., Schrenk D., Tohyama C., Tritscher A., Tuomisto J., Tysklind M., alker N., Peterson R. E. The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compound. *ToxiSci Advance Access* published July 7, 2006, 1-56
6. www.isprambiente.gov.it

OTTIMIZZAZIONE E VALIDAZIONE DI UN METODO IN ICP/MS PER LA DETERMINAZIONE DI METALLI PESANTI ED OLIGOELEMENTI NEI MANGIMI

Chiaravalle A. E., Miedico O., Laconca L., Pompa C., Tarallo M.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia

Key words: mangimi, ICP/MS, metalli pesanti

SUMMARY

A new method for the determination of 12 metals in matrix of animal feed has been optimized and validated according to an in house validation mode. This analytical method is based on a pretreatment of the sample by micro-wave mineralization followed by analysis with ion coupled plasma mass spectrometry employing dynamic reaction cell (DRC). The most important validation parameters such as specificity, linearity, repeatability, recovery, limit of quantification (LOQ) and uncertainty have been evaluated and good results in terms automation and analysis costs have been obtained.

INTRODUZIONE

La presenza di contaminanti ambientali tra i quali Piombo, Cadmio, Mercurio ed Arsenico nei mangimi rappresenta una delle principali cause di inquinamento dell'intera filiera dei prodotti di origine animale. Infatti la Direttiva CE 32/2002 stabilisce i tenori massimi di tali contaminanti nell'alimentazione degli animali.

Inoltre il controllo della qualità degli alimenti ad uso zootecnico riguarda anche altri elementi fondamentali per i vari processi fisiologici dell'animale e pertanto additivati in opportune concentrazioni (oligoelementi). Tuttavia, poiché l'ingestione di quantità eccessive di oligoelementi può causare seri rischi per la salute degli animali e dei consumatori, è necessario verificare che la concentrazione di tali additivi sia correttamente dichiarata in etichetta. Ciò ha indotto le Autorità Sanitarie Nazionali competenti, in particolare i Servizi Veterinari, ad attivare specifici piani di monitoraggio, come il Piano Nazionale di vigilanza e controllo sanitario sull'Alimentazione Animale (PNAA). L'obiettivo del suddetto programma è di assicurare, in accordo a quanto già stabilito dal Reg. CE 882/2004, un sistema ufficiale di controllo dei mangimi lungo l'intera filiera alimentare al fine di garantire un elevato livello di protezione.

La Struttura Complessa CHIMICA di codesto Istituto, già deputata al controllo ufficiale di alimenti e mangimi, ha ritenuto opportuno mettere a punto un metodo innovativo e completo per l'analisi di contaminati ed oligoelementi nei mangimi.

MATERIALI E METODI

Preparazione del campione:

500 g di diversi campioni di mangime di varia tipologia (semplici, completi e sfarinati) e destinati all'alimentazione di varie specie animali, vengono macinati e resi omogenei mediante mulino a coltelli; di essi un'aliquota di 0,50 g viene pesata con accuratezza di 0,1 mg in contenitori in teflon (VESSEL) mediante bilancia analitica posta sotto cappa a flusso laminare per evitarne la contaminazione. Si aggiungono 8,0 ml di acido nitrico (HNO_3 , 68% v/v), 2,0 ml di Perossido di Idrogeno (H_2O_2 , 120 volumi) e 100 μl di acido fluoridrico (HF, 48% v/v) e si posizionano i Vessel all'interno del forno a microonde, dove temperatura e pressione elevate assicurano una dissoluzione rapida e completa dei campioni. In tabella 1 è riportata la sequenza di mineralizzazione. Il processamento contestuale di

un bianco procedurale e di un Materiale di Riferimento o di un campione con aggiunta nota di analiti consente di tenere sotto controllo l'intero processo.

I VESSEL vengono riportati a pressione e temperatura tali da evitare perdite di materiale durante l'operazione di apertura. Le soluzioni di mineralizzazione ottenute vengono trasferite in provettoni in polipropilene da 50,0 ml e portate a volume gravimetricamente con acqua ultrapura.

Step	Potenza (Watt)	Rampa (min)	Press. (psi)	Temp. (°C)	Durata (min)
1	1200	5,00	400	120	-----
2	1200	-----	400	120	5,00
3	1200	6,00	400	190	-----
4	1200	-----	400	190	20,00

Tab. 1 Programma di Mineralizzazione. Pressione e Temperatura controllate mediante sensori.

I campioni vengono diluiti 4 volte, prelevando 5,0 ml e aggiungendo 15,0 ml di acqua Ultrapura. Tale diluizione è necessaria per evitare di introdurre nel sistema di ionizzazione (nebulizzatore, torcia e coni) elevate quantità di analiti, che potrebbero compromettere la stabilità di lettura strumentale. Inoltre, date le elevate concentrazioni di taluni analiti, la suddetta diluizione è indispensabile per rientrare nell'intervallo di taratura strumentale di ciascun elemento.

Apparecchiature: Bilancia analitica con accuratezza 0,1 mg, Mulino a coltelli modello FRITSCH Pulverisette 14 con griglia di diametro 0.5 mm, Forno a Microonde con contenitori in PTFE (VESSEL) e Spettrometro di Massa al Plasma Induttivamente Accoppiato con tecnologia di campo assiale con Cella Dinamica di Reazione (modello ELAN DRC II, PerkinElmer) equipaggiato di autocampionatore (CETAC ASX-520).

Reagenti: Acido Nitrico al 68% (v/v) di grado ultrapuro (Romil, Cambridge, GB); Acido Fluoridrico al 48% (v/v) di grado ultrapuro (Merck, Germany), Perossido di Idrogeno a 120 volumi di grado ultrapuro (Romil, Cambridge, GB), Acqua ultrapura (Romil, Cambridge, GB), Argon Ultrapuro (AIR Liquide, Italia), Ammoniaca 100% Anidra (AIR Liquide, Italia), Metano (grado di purezza N 55, AIR Liquide, Italia), Soluzioni Standards di 1000 mg/l (ICP International, Olanda) dei seguenti elementi: **Mercurio, Piombo, Cadmio, Cromo, Arsenico, Stagno, Selenio, Nichel, Ferro, Rame, Manganese e Zinco**

Le soluzioni per la taratura dello spettrometro di massa vengono preparate prelevando un opportuno volume di standard, acidificate a 2% di HNO_3 e diluite con Acqua ultrapura pesata su bilancia analitica.

Condizioni Strumentali dell'ICP/MS: Sistema introduzione del Campione: Nebulizzatore concentrico di Meinhard; Spray chambre ciclonica in quarzo. Plasma: Generatore Radio Frequenze da 1100 Watt; Flusso di Ar per il Plasma 15,0

lit/min; Flusso di Ar per nebulizzatore da 0,9 a 1,1 L/min; **Controllo pompa peristaltica:** Sample Flush 60 sec; Sample Flush speeding -32,0 rpm; Read delay 20 sec; Read delay end analysis speeding -20,0 rpm; Wash 45 sec, Wash speeding -32,0 rpm; **Condizioni di acquisizione:** Dwell time 50 ms; sweeps/reading 20; reading/replicate 1; Replicates 3; Peak Hopping; **Standard Interno:** Itrio e Bismuto, aggiunti mediante miscelatore "on-line" agli standard di calibrazione e ai campioni prima della nebulizzazione.

RISULTATI E DISCUSSIONE

La tecnica analitica, per la determinazione di arsenico (As), cadmio (Cd), mercurio (Hg), piombo (Pb), cromo (Cr), stagno (Sn), nichel (Ni), rame (Cu), selenio (Se), ferro (Fe), manganese (Mn) e zinco (Zn) nei mangimi ai fini del controllo ufficiale degli alimenti ad uso zootecnico, è basata sui conteggi delle masse isotopiche¹. Per accertare l'applicabilità del metodo sono state studiate le seguenti prestazioni analitiche:

-Specificità: 10 campioni di mangimi sono stati mineralizzati e sottoposti a determinazione strumentale sia tal quali che additivati a opportune concentrazioni dei 12 elementi. E' stata verificata l'assenza di segnali interferenti significativi in corrispondenza dei valori di rapporto massa/carica a cui vengono rivelati tutti gli analiti. Per gli analiti Fe, Cr, Ni, Cu, Zn e Mn viene adoperata la DRC con ammoniaca: l'immissione in cella di un gas reattivo consente di eliminare selettivamente gli ioni interferenti ed evitare forti sovrastime di molti isotopi. Per la determinazione del Se invece, viene usato il metano, gas maggiormente idoneo come ampiamente riportato in letteratura². L'isotopo del Selenio considerato è quello a massa 78, poiché l'isotopo 80, pur essendo più abbondante, è maggiormente interferito dal dimero [Ar40-Ar40]⁺. Infine, per una maggiore sensibilità e stabilità del segnale analitico, la determinazione di Pb, Cd, Hg, Sn ed As, viene eseguita in modalità STANDARD cioè senza utilizzo della DRC. Anche se in realtà per l'As esistono interferenze spettrali dovute al Cloro³, la diluizione eseguita in fase di lettura strumentale permette di ovviare a tali problemi.

-Linearità: Avendo a disposizione degli standard mono-elemento, è stato possibile scegliere il range di calibrazione specifico per ciascun analita, in base ai livelli di concentrazione presenti nella maggior parte dei mangimi. Infatti per i contaminanti, di solito presenti in tracce, è stato scelto un intervallo a basse concentrazioni mentre per gli oligoelementi un range a più alta concentrazione (Tabella 2).

Analita	Concentrazione (ng/ml)
Pb, Cd, Cr, As, Se, Sn, Ni	0,50- 50
Hg	0,10- 10
Cu	2,0 – 200
Fe, Mn e Zn	10,0 – 1000

Tab 2 range di concentrazione di ciascun analita

E' stata dimostrata la relazione lineare tra il segnale e la concentrazione, costruendo tre curve di taratura indipendenti (bianco di calibrazione e 4 soluzioni standard a titolo noto) e verificando che la curva media avesse determinati requisiti: intercetta non significativamente diversa da 0, $R^2 > 0.999$, rapporti segnale/concentr. non significativamente diversi.

-Limite di quantificazione (LOQ): è stato calcolato come 10 volte la deviazione standard della concentrazione di 20 bianchi

campioni, tenendo conto della pesata media e della diluizione. I valori dei LOQ in matrice sono riportati in tabella 3. Da notare che, pur utilizzando una tecnica molto sensibile (ICP-MS), i valori di LOQ sono piuttosto elevati a causa della limitata presa analitica e del fattore di diluizione.

ANALITA	Hg	Pb	Cd	As	Cr	Sn
LOQ (mg/kg)	0.03	0.02	0.0048	0.16	0.05	0.29
ANALITA	Ni	Se	Cu	Fe	Mn	Zn
LOQ (mg/kg)	0.47	0.07	0.85	2.23	0.25	2.5

Tab.3 Valori di LOQ calcolati in matrice considerando una pesata analitica di 0,5 g, un volume finale di preparazione di 50 ml e una diluizione di 4 volte

Si può notare che per Fe, Zn e Cu i valori sono sensibilmente maggiori; tuttavia i tre analiti, in quanto oligoelementi, sono generalmente presenti in concentrazioni superiori ai rispettivi LOQ. Invece, per i contaminanti Pb, Cd, Hg, Cr e As, i LOQ sono ragionevolmente contenuti.

-Ripetibilità: è stata valutata mediante l'analisi in 6 replicati di 8 campioni di mangimi, con altrettanti livelli di concentrazione per ogni elemento. Per ogni campione (e quindi per ogni livello di concentrazione) è stata calcolata la concentrazione media e lo scarto tipo per ciascun analita. Infine, mediante interpolazione lineare, è stata ricavata l'equazione della retta che descrive l'andamento della deviazione standard in funzione della concentrazione. Per tutti gli otto campioni sono stati soddisfatti i requisiti di ripetibilità, in particolare i valori di HORRAT_r sono tutti inferiori a due. In tabella 4 si riportano i valori di HORRAT_r per alcuni elementi, nell'esempio di 0.50 mg/kg.

Analita	Dev. Std. in funzione della concentrazione	R ²	HORRAT _r (0,50 mg/kg, CV% _r =18%)
Pb	0,0951*Conc.	0,97	0,53
Cd	0,0485* Conc.	0,98	0,27
As	0,0829* Conc.	0,93	0,46
Se	0,0757* Conc.	0,96	0,42
Sn	0,0775* Conc.	0,95	0,43

Tab 4 Valori di R², HORRAT_r ed equazioni delle rette per Piombo, Cadmio, Arsenico, Selenio e Stagno

-Recupero: non disponendo di una matrice di riferimento certificata simile a quella da analizzare, è stato utilizzato un campione di mangime reale, additivato secondo opportune concentrazioni dei 12 metalli nella fase precedente alla mineralizzazione. Il recupero dell'intero metodo di prova è stimato come rapporto tra i valori trovati nelle prove di lettura ed i valori teorici. I valori di recupero ottenuti per ogni analita variano da 85% a 103%. Si precisa tuttavia che i risultati finali non vengono corretti per il recupero.

-Incertezza di Misura: i valori d'incertezza di misura estesa (fattore di copertura k=2 e livello di confidenza p~0,95) sono stati calcolati mediante approccio metrologico considerando i seguenti contributi: ripetibilità, taratura metrologica, incertezza

sul criterio di accettabilità di taratura, pesata, fattore di diluizione e materiali standard certificati. I contributi maggiori sono dovuti ai primi tre parametri. I valori di incertezza estesa sono compresi tra il 14% del Ferro e il 23% del Rame.

CONCLUSIONI

Non avendo a disposizione dei materiali certificati, il suddetto metodo, una volta validato secondo la metodica sopra descritta, è stato verificato utilizzando dei materiali di riferimento di composizione alquanto simile ai mangimi semplici: NIST 1567 (*wheat flour*) prodotto dalla *National Bureau of Standard*, IAEA-V-8 (*rye flour*) e IAEA-155 (*whey powder*) prodotti dall'IAEA. In questo lavoro è stato messo a punto un metodo analitico basato su una tecnica molto sensibile e versatile (DRC-ICP-MS) che consente di determinare contemporaneamente il contenuto di 12 elementi tra cui metalli pesanti ed oligoelementi. L'utilizzo di una tecnologia avanzata, quali la cella dinamica di reazione consente di risolvere i problemi peculiari della spettrometria di massa (interferenze isobariche poliatomiche). Un altro punto di forza consiste nell'applicabilità del metodo ad ogni tipologia

di mangime (sia esso semplice, composto o integrato) e agli alimenti ad uso zootecnico destinati alle varie specie animali (ovini, caprini, suini, equini, pollame, bovini e pesci).

RINGRAZIAMENTI: Si ringrazia per il contributo professionale il Sig. Michelangelo D'Errico, dipendente di codesto Istituto in qualità di perito Chimico.

BIBLIOGRAFIA

1. Cubadda F., Inductively coupled Plasma-Mass Spectrometry for the Determination of Element and Element Species in Food: a Review, *Journal of AOAC International* (2004), Vol.87 (32)
2. Pruszkowsky E., Selenium determination in blood and serum with ICP-MS, *Field application Report* (Perkin Elmer).
3. Nixon D.E., Neubauer K. R., Eckdahl S.J., Butz J.A., Burritt M.F., Comparison of tunable bandpass reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry with conventional inductively coupled mass spectrometry for the determination of heavy metals in whole blood and urine, *Spectrochimica ACTA Part B* 59 (2004), 10

DETERMINAZIONE RADIOCHIMICA DELLO STRONZIO-90 NEL LATTE MEDIANTE SCINTILLATORE LIQUIDO AD ULTRA BASSO FONDO

Dell'Oro D., Bortone N., La Porta M., Marchesani G., Mangiacotti M., Chiaravalle A. E.

*Centro di Riferenza Nazionale per la Ricerca della Radioattività nel Settore Zootecnico Veterinario
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata - Foggia*

Key words: ^{90}Sr , milk, LSC

ABSTRACT – Strontium-90 is one of the most biologically hazardous radionuclides due to its long physical and biological half-life. It's produced in nuclear fission processes and decays to its daughter nuclide yttrium-90, that in turn decays emitting high-energy beta particles. Strontium-90 is chemically similar to calcium entering the human body through several food chains and it tends to deposit in bone and blood-forming tissue (bone marrow). The purpose of the current study was to determine low activity levels in milk samples by ultra low level liquid scintillation counting (LSC), after achieving yttrium-90 secular equilibrium condition.

INTRODUZIONE – Lo ^{90}Sr è uno dei più diffusi e pericolosi prodotti di fissione dell' ^{235}U . Ha origine esclusivamente artificiale ed è un beta emettitore puro. Lo stronzio decade nel suo isotopo figlio ^{90}Y con un tempo di dimezzamento ($t_{1/2}$) di 28.5 anni emettendo particelle beta con un'energia massima di 546 keV. L'ittrio, anch'esso un beta emettitore puro, a sua volta decade con $t_{1/2}$ di 64.1 ore in ^{90}Zr stabile con spettro beta di energia massima di 2284 keV. Quando si raggiunge l'equilibrio secolare tra ^{90}Sr e ^{90}Y la concentrazione di attività dello stronzio può essere determinata misurando quella dell'ittrio, numericamente uguale a quella dell'isotopo progenitore. Chimicamente lo stronzio appartiene al gruppo dei metalli alcalino terrosi e manifesta un metabolismo con comportamento simile a quella del calcio fissandosi nelle ossa e rappresentando, quindi, un grave rischio per la salute umana. Tra gli alimenti assunti con la dieta, il latte è considerato un ottimo indicatore di contaminazione ambientale ed è di particolare interesse, soprattutto in situazioni di emergenza radiologica come il recente incidente nucleare di Fukushima. Infatti, come tutti i radiocontaminanti lo stronzio 90 una volta introdotto nell'ambiente viene trasferito dal suolo alla vegetazione entrando così nelle diverse catene alimentari a ciclo breve e lungo: suolo-vegetale-uomo oppure suolo-vegetale-animale-uomo. Il consumo di latte contaminato, particolarmente per i bambini, rappresenta la principale causa di irradiazione interna e per questo motivo deve essere effettuato un controllo routinario dei livelli di esposizione dei diversi gruppi della popolazione. I metodi nazionali normati per la determinazione dello stronzio 90 nel latte [1-2], richiedono una serie di precipitazioni sequenziali lunghe e laboriose per la separazione radiochimica degli interferenti a cui fanno seguito misure ripetute mediante contatore proporzionale a flusso di gas.

La separazione dal calcio, chimicamente affine allo stronzio, risulta essere difficoltosa dato che tale elemento è presente in concentrazioni elevate nella maggior parte dei prodotti della filiera lattiero-casearia ed in particolar modo nel latte, dove il rapporto è circa 10.000:1.

L'ittrio, invece, è un metallo di transizione appartenente al gruppo III B della tavola periodica come lo scandio, il

lantano e l'attinio. La scarsa concentrazione presente nelle matrici alimentari, la propensione a formare complessi e il suo comportamento chimico differenziato rispetto ad altri elementi molto più diffusi nei prodotti alimentari, unitamente allo spettro beta con energia massima più elevata, permettono di effettuare una determinazione radiochimica più agevole rispetto allo stronzio.

Lo scopo del presente lavoro è stato, quindi, quello di mettere a punto e validare un metodo indiretto per la determinazione della concentrazione di attività dello stronzio-90 nel latte mediante scintillatore liquido ad ultra-basso fondo (LSC). La tecnica di conteggio in LSC offre molteplici vantaggi rispetto alle procedure tradizionali, consentendo di ottenere prestazioni elevate sia in termini di sensibilità che di produttività.

MATERIALI E METODI – Il metodo prevede l'estrazione dei cationi dal latte mediante l'aggiunta di 100 ml di resina a scambio cationico Dowex 50 W-X8 a 1 l di campione, mantenuto in agitazione per 60 minuti a pH 7. Dopo opportuni lavaggi con acqua calda fino ad eliminazione della frazione grassa si effettua una separazione in colonna cromatografica della fase stazionaria dispersa eluendo lo stronzio con acido nitrico 3 M. Il campione, una volta portato a secco totale si conserva per almeno due settimane (tempo minimo per il raggiungimento dell'equilibrio secolare $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$) prima di procedere alla separazione liquido/liquido dell'ittrio-90 mediante acido etil-esil ortofosforico (HDEHP). Si effettua poi una precipitazione dell'ossalato di ittrio a pH 2,5 per consentire l'eliminazione di alcune interferenze, sia chimiche (Fe^{3+}) che radiometriche (isotopi naturali di Bi e Pb). Il precipitato viene disciolto in 8 ml di acido cloridrico 0.1 N e 12 ml di cocktail di scintillazione Ultima Gold AB (Perkin Elmer) e analizzato poi per un tempo di conteggio di 1000 minuti mediante scintillatore liquido ad ultra basso fondo (Wallac 1220 Quantuls – Perkin Elmer), dotato di circuito di discriminazione alfa-beta. Nella procedura vengono utilizzati come carrier stronzio ed ittrio stabili per la determinazione delle rese chimiche mediante tecnica ICP/MS. Per verificare l'adeguatezza del metodo allo scopo preposto sono state eseguite prove di validazione per la stima della precisione, dell'esattezza, dell'efficienza di conteggio e della Minima Concentrazione di Attività Rivelabile (M.C.R.).

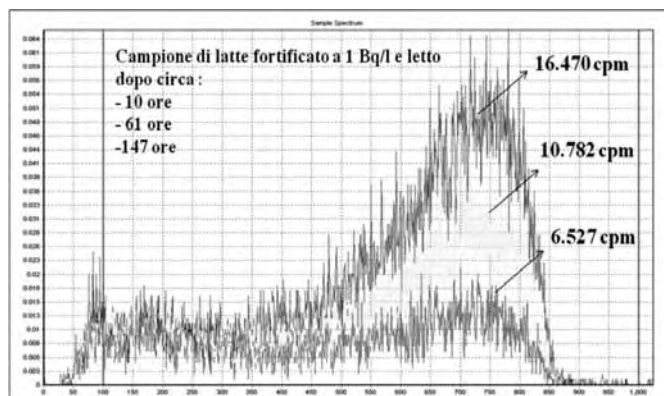
L'efficienza di conteggio è stata valutata mediante il trattamento di tre sorgenti di Stronzio-90 di attività pari a 1 Bq, trattate con la stessa procedura di separazione dell'ittrio dei campioni. La M.C.R., è stata calcolata sulla base dei conteggi di tre campioni di bianco procedurale. Per valutare la sensibilità del metodo sono state effettuate sei prove con campioni fortificati a 0.05 Bq/l, pari a circa tre volte la M.C.R. Sono state condotte prove di ripetibilità intermedia su sei campioni fortificati a due livelli di concentrazione di attività

pari a 0,5 e 1 Bq/l da due operatori diversi utilizzando la stessa procedura e lo stesso materiale di prova. Per poter valutare la selettività del metodo sono state effettuate misure ripetute di un campione di latte fortificato con una sorgente di stronzio-90 alla concentrazione di attività pari a 1 Bq/l confermando la sola presenza di ittrio-90 in base alla forma dello spettro β , ai conteggi totali ed alla verifica della legge di decadimento del radionuclide stesso.

Per la valutazione dell'accuratezza del metodo è stato analizzato un materiale di riferimento certificato, latte in polvere (IAEA -152) contaminato da stronzio-90 in seguito all'incidente nucleare di Chernobyl.

RISULTATI E DISCUSSIONE – Il metodo sviluppato per la determinazione dello stronzio-90 nel latte mediante conteggio in scintillatore liquido ad ultra basso fondo risulta meno laborioso e più efficace se confrontato con i metodi ufficiali. Infatti, l'utilizzo di un contatore proporzionale a flusso di gas presuppone una lunga serie di precipitazioni e purificazioni al fine di garantire una buona separazione radiochimica dello ^{90}Sr dal momento che tale sistema di conteggio non consente una discriminazione del radioisotopo emittente. Con tale tecnica, per poter confermare o meno la presenza dell'analita di interesse bisogna effettuare misure ripetute, a distanza di giorni, per verificare il decadimento del segnale. Il metodo con scintillatore liquido, invece, consente di registrare spettri sia di particelle alfa che beta con buona discriminazione delle sorgenti di emissione. L'analisi dello spettro consente, in un'unica misura, di valutare rapidamente la presenza dei diversi radioisotopi o di possibili interferenti che non sempre vengono eliminati completamente nella fase di purificazione radiochimica. In questo modo, per ogni campione, può essere effettuata una corretta discriminazione dei radioisotopi riducendo così i tempi di analisi con controllo di qualità del dato analitico. Di seguito viene riportato lo spettro caratteristico di un campione di latte vaccino fortificato alla concentrazione di attività pari a 1 Bq/l letto a distanza di tempo (fino a 2 volte il $t_{1/2}$ dell'ittrio-90) per verificare l'assenza di eventuali interferenti. Come si evince in figura 1 gli spettri al variare del tempo manifestano sempre una forma caratterizzata dalla presenza di un massimo in una finestra energetica ben definita mentre i conteggi totali diminuiscono secondo la legge di decadimento dell'ittrio 90.

Figura 1: Studio di selettività per la verifica del decadimento nel tempo di un campione di latte fortificato a 1 Bq/l con ^{90}Sr .

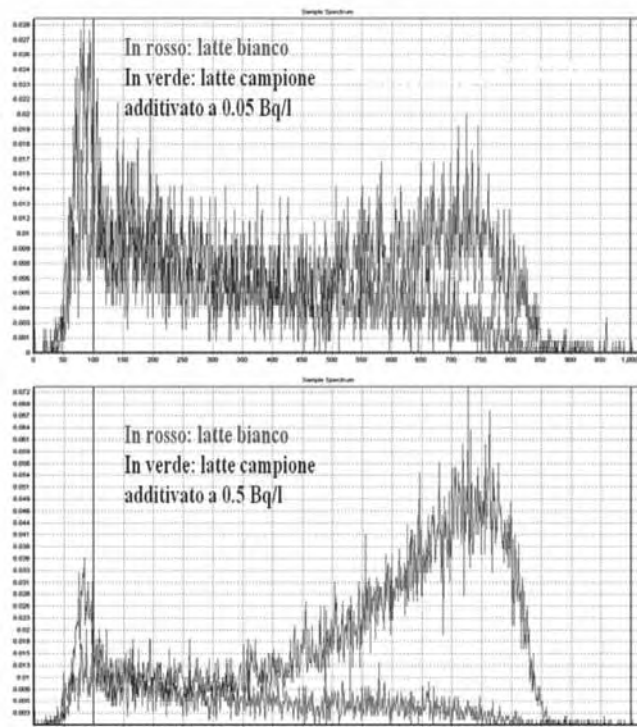


La tecnica LSC fornisce, inoltre, efficienze di conteggio delle sorgenti prossime al 100 % per gli alfa emettitori e tra

l'80% e il 90% per i beta emettitori [3], notevolmente più elevate rispetto alle tecniche tradizionali. Nel nostro studio di validazione, sulla base di prove ripetute su una sorgente di stronzio 90 di attività pari a 1 Bq si è ottenuta un'efficienza di conteggio dell'89%, mentre la minima concentrazione di attività rivelabile è risultata pari a 0.014 Bq/l. Prove condotte ad un livello prossimo alla M.C.R. pari a 0.050 Bq/l mostrano un'efficienza complessiva di conteggio del metodo pari al $72\% \pm 14\%$ ($n=6$) e segnali distinguibili dal fondo così come mostrato in figura 2. Il metodo mostra buoni valori di ripetibilità calcolati in termini di CV% sulla base dei risultati delle prove condotte su sei campioni di latte fortificati a livelli di concentrazione di attività di ^{90}Sr di 0.5 e 1 Bq/l pari rispettivamente a 12.6% e 13.0%. Il recupero, calcolato come rapporto tra la concentrazione di attività misurata al termine del processo analitico e quella aggiunta inizialmente, risulta essere pari al 99% al livello di concentrazione di attività di 1 Bq/l ed al 106% a 0.5 Bq/l.

Per la valutazione dell'accuratezza del metodo è stato analizzato un materiale di riferimento (IAEA 152) il cui valore certificato di concentrazione di attività dello ^{90}Sr alla data del 31 Agosto 1987 è pari a 7,7 Bq/kg con un intervallo di accettabilità compreso tra $7.0 \div 8.3$ Bq/kg ad un livello di confidenza del 95%.

Figura 2: Spettri di campioni di latte fortificati con ^{90}Sr a 0.05 Bq/l e 0.5 Bq/l in overlay con i rispettivi bianchi campione.



Su due campioni replicati è stato ottenuto un valore medio di concentrazione di attività di ^{90}Sr pari a 7.16 ± 1.67 Bq/kg ($p=95\%$, $k=2$), confermando la compatibilità dei risultati entro gli errori sperimentali. L'applicabilità della metodica analitica è stata, inoltre, testata su campioni di latte U.H.T. provenienti dal mercato internazionale con livelli di contaminazione radioattiva di ^{90}Sr quantificabili ma inferiori al valore di 0.05 Bq/l. L'intera procedura analitica, incluso il sistema di conteggio, è stata sottoposta a rigorosi programmi di controllo di qualità mediante la costruzione e l'utilizzo di

carte di controllo nel rispetto delle prescrizioni della norma internazionale ISO/IEC 17025:2005. In sintesi il metodo sviluppato garantisce, nel rispetto dei parametri considerati, soddisfacenti caratteristiche di sensibilità, selettività, precisione ed esattezza e può rappresentare, pertanto, una valida alternativa ai metodi tradizionali. La tecnica del conteggio mediante scintillatore liquido ad ultra basso fondo, nonostante i costi più elevati della strumentazione, fornisce informazioni aggiuntive relative alla distribuzione energetica degli spettri beta ed alla natura delle radiazioni (discriminazione alfa/beta) oltre alle sensibilità molto elevate. In conclusione il metodo proposto rappresenta la tecnica analitica più affidabile per l'identificazione degli isotopi di radiostronzio nel latte in condizioni routinarie estendendo il campo di applicazione a livelli molto bassi,

utili in situazioni di emergenza nucleare oltre che nei normali piani di sorveglianza sanitaria a tutela della salute umana.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- 1] UNI 9882:1991- Determinazione dei principali radionuclidi nel latte.
- 2] UNI 10374:1994 - Metodo rapido di determinazione di ⁹⁰Sr e di ⁸⁹Sr nel latte e in matrici simili.
- 3] F. Schönhofer, 1995, Liquid scintillation spectrometry in environmental measurements, The Science of total environment, 173/174, 29-40.

RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento a Sig. Donato Annicchiarico per la collaborazione ed il supporto tecnico.

RISULTATI DEI CONTROLLI PER LA RICERCA DI ALIMENTI O INGREDIENTI TRATTATI CON RADIAZIONI IONIZZANTI

Marchesani G., Mangiacotti M., Floridi F., Siragusa G., Chiaravalle A. E.

Centro di Riferenza Nazionale per la Ricerca della Radioattività nel Settore Zootecnico-Veterinario, IZS Puglia e Basilicata, Foggia;

Key words: Food irradiation, official check.

ABSTRACT – Food irradiation can be used to increase the microbiological safety and to extend the shelf life of foods. Community legislation states that any food or food ingredients must be labelled and that every year each Member State, particularly Italy, has to carry out checks at marketing stage. This work reports the results of analytical controls on 413 foodstuff samples over the period 2006-2011 and analysed with 4 different screening and confirmatory techniques: PSL, DNA Comet Assay, TL and ESR.

INTRODUZIONE – Le radiazioni ionizzanti (raggi gamma, raggi X e fasci di elettroni) sono utilizzate in campo alimentare per diversi scopi: ridurre la contaminazione di microrganismi alteranti, putrefattivi e soprattutto patogeni, devitalizzare eventuali parassiti, inibire la germogliazione in alcuni vegetali e aumentare la shelf-life dell'alimento, mantenendo pressoché inalterata la qualità organolettica e nutrizionale del prodotto di partenza. Pur essendo una tecnologia con indiscusse potenzialità, la food irradiation è al centro di numerose controversie dovute per lo più alla diffidenza dei consumatori che, essendo disinformati, sono intimoriti dalla terminologia utilizzata e temono rischi per la propria salute. I numerosi studi finora condotti hanno confermato l'assenza di effetti nocivi sugli alimenti trattati con tale tecnologia, determinando solamente in pochi casi e per un ristretto numero di tipologie alimentari, una ridotta perdita di alcune vitamine, paragonabile a quella ottenuta con altre tecnologie più diffuse quali ad es. i trattamenti termici. Il quadro normativo europeo che regola l'intero settore differisce da quello internazionale, molto meno restrittivo, e comprende due Direttive Comunitarie (1999/2/CE e 1999/3/CE) che l'Italia ha recepito con il D.Lgs. n° 94 del 30/01/01 (1). In tali direttive viene specificato che il limite massimo a cui gli alimenti possono essere irraggiati è di 10 kGy e che il trattamento deve essere riportato in etichetta con la dicitura "irradiato" o "trattato con radiazioni ionizzanti". L'unica categoria alimentare, presente in una lista positiva ed autorizzata a circolare liberamente sul mercato di ciascuno Stato Membro, è costituita da erbe aromatiche essiccate, spezie e condimenti vegetali, mentre altre tipologie di alimenti possono essere irraggiate solo se autorizzate a livello nazionale. Il regolamento prevede anche che ciascuno Stato Membro effettui controlli sugli impianti d'irraggiamento e sugli alimenti presenti in fase di commercializzazione sia in forma sfusa che confezionata. A tal proposito i laboratori dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, hanno validato e accreditato tutti i metodi normati di tipo fisico, sia di screening (Luminescenza fotostimolata - PSL) che di conferma (Risonanza Elettronica di Spin - ESR, Termoluminescenza - TL) unitamente al metodo di screening di tipo biologico (DNA Comet Assay) per l'identificazione di alimenti o ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti. In questo lavoro verranno presentati i risultati dei controlli effettuati su matrici alimentari sia di origine animale che vegetale presenti sul mercato italiano e di importazione, relativi al periodo dicembre 2006 - agosto 2011.

MATERIALI E METODI – Elemento essenziale per effettuare i piani di controllo ufficiale sulla presenza di prodotti trattati con radiazioni ionizzanti sui mercati nazionali è la fase del campionamento. Per garantire la corretta rappresentatività ed omogeneità di ciascun campione sono stati coinvolti gli organi di prelievo ufficiali distribuiti sull'intero territorio nazionale (Uffici Periferici del Ministero della Salute ed Organi del Servizio Sanitario Nazionale) a cui sono state trasmesse tutte le istruzioni e le informazioni riguardanti le modalità di prelievo. Tali indicazioni sono state fornite dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata e riguardano: quantità di campione per ogni singola aliquota sufficiente ad eseguire l'analisi, modalità di conservazione e di trasporto avendo cura di tenere il campione al riparo da fonti luminose e/o di calore per le matrici da analizzare con tecniche di luminescenza (PSL e TL) ed, infine, eventuali informazioni riportate in etichetta con particolare riferimento alla provenienza ed alla classificazione del prodotto in esame. I piani di controllo sono stati effettuati utilizzando i metodi di screening e di conferma riportati in tabella 1 con i relativi campi di applicazione. Le tecniche di luminescenza, PSL e TL, prevedono l'utilizzo di una stimolazione ottica e termica rispettivamente, sui minerali silicati presenti come contaminanti nei campioni. La tecnica del DNA Comet Assay prevede una corsa elettroforetica su gel di agarosio di singole cellule estratte da tessuto animale o vegetale, seguita da un'analisi dell'immagine con microscopio in epifluorescenza. La risonanza elettronica di spin (ESR), invece, prevede la determinazione di specie radicaliche stabili radio-indotte specifiche in matrici contenenti ossa, cellulosa o zucchero cristallino.

Tabella 1 – Standard e rispettivi campi di applicazione utilizzati nei controlli effettuati negli anni 2006-2011.

STANDARD	TECNICA	METODO	Campo di applicazione
EN 13784/2001	DNA Comet (2) Assay	SCREENING	Carne, semi, frutta secca e spezie
EN 13751:2009	PSL (3)	SCREENING	Erbe e spezie, molluschi e crostacei
EN 1788:2001	TL (4)	CONFERMA	Erbe, spezie, gamberetti, patate, frutta e vegetali
EN 1786:1996	ESR (5)	CONFERMA	Alimenti contenenti ossa
EN 1787:2000	ESR (6)	CONFERMA	Alimenti contenenti cellulosa
EN 13708/2001	ESR (7)	CONFERMA	Alimenti contenenti zucchero cristallino

La strumentazione in dotazione comprende: un lettore di luminescenza fotostimolata della SURRC; un lettore di termoluminescenza della Riso - TL/OSL Reader Mod. DA-20; un microscopio ad epifluorescenza della Optica Mod. B-350; uno spettrometro di risonanza elettronica di spin della Bruker Mod. EMX-113 ed un irraggiatore a raggi X della Rad Source Mod. RS-2400. Tutte le procedure di analisi utilizzate sono state effettuate da personale altamente qualificato ed includono programmi di assicurazione della qualità, previsti dalla ISO EN 17025:2005, quali: conferma metrologica, controlli di qualità interni e partecipazione a circuiti di inter-confronto. I campioni analizzati sono stati divisi in 6 categorie: prodotti carnei (P.C.); prodotti ittici (P.I.); erbe, spezie e condimenti (E.S.C.); frutta (F); vegetali (V); altro (A). Il protocollo di analisi ha previsto l'uso del DNA Comet Assay come screening e dell'ESR come conferma per i campioni appartenenti alla categoria prodotti carnei (anche se tale protocollo è stato applicato per i controlli ufficiali solo nel 2011), mentre per la maggior parte dei campioni della categoria P.I. e E.S.C. è stata utilizzata la combinazione PSL come screening e TL come conferma. E' opportuno ricordare che non tutte le tipologie di prodotti, come ad esempio frutta, polpi, calamari etc possono essere analizzate con le tecniche di screening perché privi di marker specifici dell'irraggiamento o di requisiti specifici richiesti dai metodi ufficiali.

RISULTATI E DISCUSSIONE – Le informazioni relative al numero di campioni ed analisi suddivise per anno e per tipo di metodica utilizzata sono riportate in tabella 2. Il n° di campioni totali pervenuti nel periodo preso in considerazione è di 413, mentre il n° di analisi effettuate è di 438, includendo quelle indagini con risultati intermedi o positivi allo screening.

Tabella 2 – Numero di campioni ed analisi suddivise per anno e per metodica utilizzata

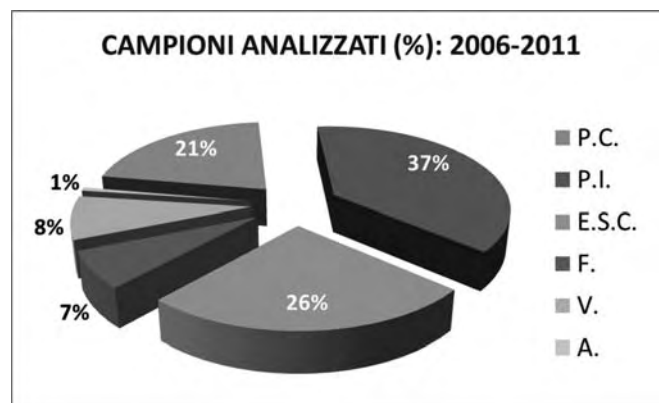
ANNO	DNA Comet Assay	PSL	ESR	TL	TOTALE ANALISI	TOTALE CAMPIONI
2006			2		2	2
2007			12		12	12
2008		10	8		18	18
2009		10	8	3	21	21
2010		37 (*1)	35 (*2)	4	76 (*3)	75 (*2)
2011	17	161 (*6)	57 (*5)	74 (*8)	309 (*19)	285 (*13)
TOTALE	17	218 (*7)	122 (*7)	81 (*8)	438 (*22)	413 (*15)

* N° di analisi non conformi; ^ N° di campioni non conformi

Il n° complessivo di analisi relative ai controlli nel periodo dicembre 2006 – agosto 2011 presenta un trend in crescita con l'incremento maggiore registrato nell'anno 2011. Anche il numero e l'applicazione delle diverse metodologie sono aumentati nel corso degli anni passando dall'utilizzo della sola tecnica ESR nel 2006 all'attuale impiego di ben 4 tecniche di cui 2 metodi di screening (DNA Comet Assay – PSL) e 4 metodi di conferma (ESR – TL), sufficienti per l'identificazione del trattamento radiante sulla quasi totalità delle tipologie alimentari presenti in commercio. Il 50 % delle analisi effettuate è stato eseguito con la PSL, seguita dall'ESR e dalla TL, mentre solo pochi campioni sono stati analizzati in DNA Comet Assay, in quanto tale metodologia è stata di recente validata e accreditata. I risultati ottenuti confermano che la PSL è una metodologia versatile e

idonea per lo screening di numerose matrici alimentari. In figura 1 è riportato un grafico con le percentuali delle analisi suddivise per ciascuna categoria alimentare. Il 37% delle analisi effettuate riguarda la categoria dei prodotti ittici che comprende principalmente molluschi, crostacei e pesci; il 21% riguarda i prodotti carnei che includono: carne di pollo, manzo, maiale, cosce di rana, etc. contenenti osso; il 26% riguarda la categoria erbe, spezie e condimenti rappresentata da: aglio, cipolla, peperoncino, origano, pepe, condimenti o insaporitori vari, etc.; il 7% riguarda la frutta fresca quale mango, papaya, banane, fragole, nespole, etc. e quella secca con guscio quale pistacchi, noci, mandorle etc.; l'8% riguarda i vegetali costituiti soprattutto da patate e funghi, inclusi alcuni campioni di grano; ed infine l'1% della categoria "altro" include un campione di tofu, un integratore salino ed un campione di zucchero marrone. La frutta secca con gusci, le fragole e tutti i campioni appartenenti alla categoria prodotti carnei sono stati analizzati in ESR, eccetto 17 campioni analizzati con DNA Comet Assay, mentre tutti i campioni di frutta fresca sono stati analizzati in TL. In generale la scelta del metodo idoneo per l'analisi dei restanti campioni dipende, per ciascuna metodica, principalmente dalla tipologia alimentare e dal campo di applicazione. Circa l'8% dei campioni analizzati in PSL ha dato risultati non interpretabili o falsi positivi, analizzati successivamente con le opportune tecniche di conferma. Tutti i 17 campioni analizzati con la tecnica del DNA Comet Assay sono stati correttamente identificati e l'assenza di falsi positivi o risultati dubbi è, con molta probabilità, da attribuire alla esigua quantità di campioni ufficiali finora eseguiti.

Figura 1 – Percentuale di campioni analizzati dal 2006 al 2011 distinti in base alla categoria di appartenenza.



Dall'analisi dei dati si evince che su un n° totale di 15 campioni risultati non conformi, di cui solo 2 campioni su un totale di 75 (2,7 %) sono stati rilevati nel 2010, mentre ben 13 campioni su un totale di 285 (4,6 %) sono risultati positivi nel 2011, anno in cui il numero delle analisi è considerevolmente aumentato. Le tipologie di matrici che sono risultate non conformi sono: 6 campioni di cosce di rana provenienti dalla Francia e dal Vietnam; 3 campioni di vongole, 2 campioni di seppie e 1 campione di gamberi provenienti dal Vietnam; 1 campione di calamari e 1 campione di tofu provenienti dalla Cina ed 1 campione di coriandolo proveniente dall'Ucraina. In particolare i campioni di vongole, il tofu (contenente peperoncino), il coriandolo ed i gamberi sono stati analizzati sia in screening (PSL) che in conferma (TL). In seguito alle comunicazioni di positività,

il Ministero della Salute ha attivato numerose procedure di allerta comunitaria (RASFF - Rapid Alert System for Food and Feed) relative alle tipologie di campioni risultati non conformi. In conclusione dall'elaborazione dei risultati dei controlli effettuati per l'identificazione di alimenti o ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti, emerge la necessità di indirizzare i campionamenti principalmente sulle tipologie di prodotti già risultati positivi o provenienti da Paesi in cui sono attivi numerosi impianti di irraggiamento; e questo non per creare allarmismi ingiustificati, ma per consentire al consumatore la possibilità e il diritto di scelta.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- 1) D. L.vo n° 94 del 30 gennaio 2001, G.U. n° 79 del 4 aprile 2001.
- 2) UNI EN 13784:2001 – Ricerca di alimenti irraggiati con tecnica di DNA Comet Assay.
- 3) UNI EN 13751:2009 - Ricerca di alimenti irraggiati con l'utilizzo di luminescenza fotostimolata (PSL).
- 4) UNI EN 1788:2001 – Ricerca per termoluminescenza di alimenti irraggiati dai quali possono essere isolati i minerali silicati.
- 5) UNI EN 1786:1997 - Ricerca di alimenti irraggiati contenenti ossa. Metodo per spettroscopia di risonanza elettronica di spin (ESR).
- 6) UNI EN 1787:2000 – Ricerca di alimenti irraggiati contenenti cellulosa mediante spettroscopia di risonanza elettronica di spin (ESR).
- 7) UNI EN 13708:2001 – Ricerca di alimenti irraggiati contenenti zucchero cristallino mediante spettroscopia di risonanza elettronica di spin (ESR).

ANALISI FILOGENETICA ED EVOLUZIONISTICA DEI CEPPI INFLUENZALI SUINI H1N2 IN ITALIA

Moreno A., Sozzi E., Lelli D., Foni E., Chiapponi C., Fontana R., Alborali L., Cordioli P.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), Brescia

Key words: influenza suina, sottotipo H1N2, caratterizzazione molecolare

SUMMARY

We investigated the genomic evolution of the H1N2 subtype in Italy since the first isolation in 1998 to 2010. During this period, 66 H1N2 SIVs were detected and partially sequenced. For a deeper examination 26 strains were selected. Phylogenetic analysis of HA and NA genes showed differences between the older (1998-2003) and the more recent strains (2003-2010). The older isolates were closely related to the established European H1N2 lineage, whereas the more recent isolates showed a different NA deriving from human H3N2 viruses of 1997. Moreover two atypical strains have also been detected. These results showed the presence and establishment of reassortant strains involving human viruses in pigs in Italy.

INTRODUZIONE

I virus influenzali tipo A sono diffusi in molte specie animali tra cui volatili, suini ed uomo. Nel suino sono diffusi tre sottotipi H1N1, H3N2 ed H1N2. Il sottotipo H1N2, isolato per la prima volta in Gran Bretagna nel 1994 e successivamente in Italia nel 1998, deriva dal riassortimento genetico tra tre differenti virus influenzali. Possiede, infatti, la emoagglutinina (HA) di un virus H1N1 umano circolante nei primi anni '80, la neuraminidasi (NA) di un virus H3N2 di origine umana ed i sei geni interni dei virus H1N1 e H3N2 europei di origine aviaria (1). Lo scambio di geni virali tra diversi virus influenzali attraverso fenomeni di riassortimento è un evento frequentemente riportato nella specie suina. In questa specie è stata infatti dimostrata la presenza di recettori NeuAc 2,3 Gal e 2,6 Gal caratteristici di virus influenzali aviari ed umani. Per questo motivo, è stato ipotizzato il ruolo del suino come mixing vessel e, recentemente, è stato identificato come reservoir di virus con potenziale pandemico (7). Lo scopo del presente lavoro riguarda l'analisi filogenetica e molecolare di 26 ceppi H1N2 isolati in Italia dal 1998 al 2010 attraverso il sequenziamento completo dei geni HA e NA, il confronto con le sequenze di ceppi influenzali suini (SIV), umani ed aviari (AIV) presenti in banca dati ed il calcolo dell'antenato comune più recente (tMRCA). L'analisi filogenetica è stata eseguita allo scopo di verificare le relazioni genetiche fra virus influenzali appartenenti allo stesso sottotipo o a sottotipi differenti, per meglio comprendere l'importanza della continua evoluzione e la comparsa di possibili fenomeni riassortanti.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Nel periodo compreso tra il 1998 ed il 2010, sono state eseguite indagini virologiche su tamponi nasali e polmoni di suini con sintomi clinici e lesioni anatomopatologiche riferibili a malattia respiratoria acuta.

Virus

I ceppi utilizzati in questo studio sono stati isolati su uova embrionate di pollo e/o su linee cellulari MDCK e Caco-2. La determinazione del sottotipo virale è stata infine eseguita con l'utilizzo di due multiplex RT-PCR per la determinazione della H e della N (2).

Sequenziamento ed analisi filogenetica

La caratterizzazione molecolare dei ceppi H1N2 è stata eseguita attraverso il sequenziamento parziale dei geni HA e NA di 66 ceppi e completo di 26 ceppi selezionati (3). Le sequenze ottenute sono state analizzate in BLAST e confrontate con quelle di ceppi di riferimento ottenute in GenBank mediante allineamento con CLUSTAL W. L'albero filogenetico è stato costruito con il programma MEGA 5 utilizzando il metodo maximum likelihood, modello Tamura Nei(8). Il calcolo del tMRCA è stato stimato mediante analisi Bayesiana con il metodo delle catene di Monte Carlo con il modello evolutivo GTR+G4 per la condizione di orologio stretto (9). La corsa è stata condotta per 50 milioni di catene campionando ogni 1000. L'albero è stato generato con il massimo prodotto della *posterior probability* dopo un *burnin* del 10%. Sui geni HA e NA è stata inoltre eseguita una stima del tasso di sostituzione sinonimo e non sinonimo (dN/dS). Sono stati preparati 3 set di dati (European SIV H1human-like, European SIV H1 avian-like, European SIV N2) con le sequenze dei ceppi italiani e di riferimento ottenute da NCBI Influenza Virus Resource. Sono state prese in considerazione solo sequenze codificanti le proteine complete. Per ogni data set il rapporto dN/dS è stato calcolato utilizzando il metodo Fixed Effects Likelihood (FEL) disponibile in Datamonkey online version (Hy-Phy package) (4).

RISULTATI

Nel periodo 1998-2010 sono stati isolati e caratterizzati 66 virus influenzali H1N2. Di questi 26 sono stati scelti per una analisi filogenetica approfondita. L'albero filogenetico delle sequenze del gene HA ha evidenziato che i ceppi H1N2 (human-like) formano un cluster derivato dai ceppi umani H1N1 circolanti negli anni '80 e chiaramente distinguibile dai ceppi H1N1 (avian-like). I ceppi isolati in Italia negli anni 1998-2003 presentano un'elevata omologia con i ceppi H1N2 europei. I ceppi italiani recenti (2003-2010) formano un cluster separato dai "vecchi" ceppi precedentemente descritti e probabilmente derivano da due ceppi isolati nel 1998 (A/sw/It/1521/98 e A/sw/It/62/98). E' da sottolineare anche la presenza di due ceppi H1N2 riassortanti (A/sw/It/22530/02 e A/sw/It/58769/10), la cui HA presenta un'elevata percentuale di omologia con i ceppi suini H1N1.

L'analisi delle sequenze del gene NA ha dimostrato che i ceppi H1N2 "vecchi" sono altamente correlati con il ceppo capostipite H1N2 Scot/410440/94 e con tutti gli altri ceppi H1N2 isolati in Europa dal '98 fino al 2010. Un dato molto interessante inoltre riguarda i ceppi recenti che presentano una N2 chiaramente distinta dai ceppi H1N2 suini europei. Questi ceppi clusterizzano con i ceppi H3N2 umani, isolati nella stagione 1997; la maggiore percentuale di omologia infatti si presenta con il ceppo A/HK/CUHK20199/97 isolato nel 1997 (95,1-97,1%). Solo uno dei ceppi isolati di recente (A/sw/It/58769/10) possiede una NA diversa dai precedenti, altamente correlata con i ceppi SIV H3N2. E' da sottolineare in particolare l'elevata omologia di questo ceppo sia per il gene HA che NA con due ceppi H1N2 isolati in Svezia (6).

La stima della divergenza temporale per il gene HA indica che i ceppi italiani recenti si sono probabilmente evoluti da un antenato comune, correlato con i ceppi 62/98 e 1521/98, che circolava nella popolazione suina tra la fine degli anni 90 e l'inizio del 2000. Per quanto riguarda il gene NA dei ceppi italiani sono state evidenziate due linee evolutive differenti: una per i vecchi ceppi il cui antenato risale a inizio anni novanta ed un'altra per i ceppi recenti che probabilmente derivano da un antenato comune che circolava nella popolazione suina agli inizi del 2000. E' stato inoltre evidenziato un maggior tasso di variazione genica per il gene NA rispetto al gene HA, espresso come sostituzioni per sito per anno rispettivamente 28×10^{-3} (3,04-3,52 95%HPD) e $2,90 \times 10^{-3}$ (2,69-3,12 95%HPD).

I valori del rapporto dN/dS, stimati per ogni set di dati, sono risultati 0,166 per H1 avian like, 0,234 per H1 human like e 0,177 per N2. Malgrado il valore più elevato sia stato evidenziato per la H1 human-like, soltanto nella H1 avian-like sono stati individuati degli aa sottoposti a pressione selettiva positiva nelle posizioni 11, 159, 338.

DISCUSSIONE

Il sottotipo H1N2 è stato l'ultimo a stabilirsi nella popolazione suina europea ed in particolare in Italia dal 1998. Negli anni 1998-2003, il numero di ceppi italiani H1N2 è risultato molto basso (3%) con addirittura nessun isolato nell'anno 2004. Dal 2005 invece la loro frequenza si è incrementata notevolmente essendo negli ultimi 2 anni il sottotipo più frequentemente isolato (37%) rispetto al H1N1 (35%) ed al H3N2 (28%). Studi evolutivi recenti condotti sui ceppi suini H1N2 europei (4) hanno ipotizzato che il genotipo H1N2 in Europa si sarebbe formato a partire da un ceppo precursore dotato di una NA di derivazione umana. Questo precursore avrebbe incorporato in seguito la HA da ceppi H1N1 umani. Questi dati risultano in linea con quanto evidenziato nel presente studio. Sembrerebbe quindi che i ceppi precursori H1N2 abbiano circolato nel territorio europeo per alcuni anni prima della identificazione del primo isolato nel 1994 in Scozia. Molteplici fenomeni di riassortimento sono stati ipotizzati nella evoluzione di questi virus. In particolare si segnala la presenza di tre ceppi H1N2 riassortanti caratterizzati da una HA derivante dai ceppi

SIV H1N1: un ceppo (Sw/It/2064/99) previamente descritto (5) ed altri due sw/It/22530/02 e sw/It/58769/10 sequenziati nel presente lavoro. Quest'ultimo ceppo possiede anche la NA altamente correlata con i ceppi SIV H3N2. Questi eventi confermano la frequenza di fenomeni di riassortimento tra ceppi suini dei diversi sottotipi tuttavia questi nuovi ceppi riassortanti non sembrano essere completamente adattati in quanto non si sono diffusi nella popolazione suina. Notevole interesse rivestono i ceppi italiani H1N2 recenti (2003-2010) che probabilmente derivano da un riassortimento tra i ceppi H1N2 suini ed i ceppi H3N2 umani. Nel 2003 sono stati isolati solo 2 ceppi H1N2 ma soltanto uno con queste caratteristiche. Dal 2005 dopo un anno senza nessun isolamento tutti i ceppi H1N2 isolati nel nostro Istituto tranne 1 possiedono invece la NA derivata dai ceppi umani H3N2. A differenza dei ceppi riassortanti evidenziati precedentemente, questi nuovi ceppi sembrerebbero essere maggiormente adattati alla popolazione suina e rappresentano la totalità dei ceppi H1N2 isolati in questi ultimi anni. L'analisi evolutiva condotta ha rilevato infatti due linee evolutive diverse per i ceppi italiani. I ceppi vecchi altamente correlati con i ceppi suini europei H1N2 ed i nuovi derivati da un antenato comune che probabilmente avrebbe incorporato una NA derivata dal virus H3N2 umani del 1997 più o meno nell'anno 2000. Segnalazioni di ceppi simili non sembrerebbero essere state riportate in Europa tuttavia il numero di ceppi europei depositati in banca dati è ancora limitato in particolare per quanto riguarda l'Est Europa.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Brown et al. (1998). J Gen Virol, 79: 2947-55
- 2- Chiapponi et al. (2003). 4 symp emerging and re-emerging pig diseases, Rome, pp 257-258
- 3- Hoffman et al. (2001). Arch Virol, 146: 2275-89
- 4- Kosakovsky Pond et al. (2005). Mol Biol and Evol, 22:1208-22
- 5- Lam et al. (2008). Virus Res, 131: 271-278
- 6- Metreveli et al. (2011). Virus Genes, 42: 236-44
- 7- Tacker et al. (2008). J Infect Dis, 197(1): S19-24
- 8- Tamura et al. (2011). Mol Biol and Evol, doi10.1093
- 9- Vijaykrishna et al. (2011). Nature, 473: 519-523

QUADRO EPIDEMIOLOGICO RISULTANTE DAL PIANO DI SORVEGLIANZA PER L'ANEMIA INFETTIVA DEGLI EQUIDI NEL QUADRIENNIO 2007-2010

²Forletta R., ³Ferri G., ¹Nardini R., ¹Ricci I., ¹Scicluna M. T., ¹Scaramozzino P., ¹Autorino G. L., ¹Sala M.,

(1) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Sede di Roma (2) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, CRAIE, Sezione di Pisa, ³Direzione generale Sanità Animale e Farmaco Veterinario, Ministero della Salute, Roma

Keywords: anemia, piano di sorveglianza, situazione epidemiologica

ABSTRACT: This paper describes the surveillance data stratified for species and region, for the 2007-2010 period of the equine infectious anemia control programme. Prevalence has a decreasing trend throughout four years, with the highest concentration in the central region of Italy and in mules, in which it is 50-60 times more than in horses. Some hypothesis are proposed to explain this data, such as environment, work attitude and breeding conditions. Data on geospatial analysis and laboratory test are also displayed, and their influence on prevalence is investigated. Further epidemiological investigations are in course.

INTRODUZIONE

A partire dal 2007 sono stati attivati Piani Nazionali di Sorveglianza (PNS) volti al controllo dell' Anemia Infettiva Equina (AIE) (1). Dal 2007 al 2009 i PNS prevedevano un controllo annuale su tutti i soggetti presenti sul territorio nazionale, eccetto quelli allevati per la macellazione. Dal 2010, per le regioni con bassa prevalenza, la cadenza del controllo è stata definita su base biennale.

I campioni positivi presso i laboratori periferici sono stati sottoposti a conferma presso il Centro di Referenza Nazionale (CRAIE). Ai fini della diagnosi di prima istanza sono stati impiegati sia l'immunodiffusione in gel di Agar (AGID) che l'ELISA in relazione alle scelte operative dei differenti laboratori. Vengono di seguito rappresentati i dati relativi alle attività svolte nel corso degli anni 2007-2010, raccolti attraverso il database nazionale, nonché alcune considerazioni preliminari sui casi accertati nel corso dei primi otto mesi del 2011 nelle regioni a più elevata prevalenza.

MATERIALI E METODI

Le informazioni riportate si riferiscono agli esami sierologici sui campioni prelevati. Le elaborazioni sono state condotte sulla base dei dati trasmessi con periodicità trimestrale nell'ambito del flusso nazionale.

Si riportano i risultati relativi ai campioni analizzati ed alle prove sierologiche di conferma eseguite dal CRAIE riferiti ai campioni testati, risultando inattuabile un'identificazione univoca degli individui sulla base di microchip o numero di passaporto. Utilizzando questi dati sono state stimate le prevalenze nelle diverse specie di equidi.

Ai fini delle valutazioni epidemiologiche nelle regioni ad elevata prevalenza, relativamente ai casi accertati nel 2011, sono state prese in considerazione:

- § la distanza tra aziende con positività;
- § l'insorgenza di nuovi casi nelle aziende già positive negli anni precedenti;
- § le tecniche diagnostiche utilizzate nel corso della sorveglianza in relazione alla rispettiva sensibilità.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Complessivamente, nel periodo 2007-2010, sono stati

controllati 973.757 campioni di equidi, mentre i campioni confermati positivi sono stati 2.098. Il dettaglio suddiviso per anno e per specie è riportato in Tabella 1. Dai dati esposti emerge l'elevato numero di campioni di mulo positivi rispetto al numero totale degli esaminati. Il calcolo della prevalenza per specie mostra infatti nella popolazione mulina una prevalenza maggiore rispetto a quelle asinina ed equina per l'intero quadriennio. Il dettaglio delle prevalenze per specie è riassunto in Tabella 2.

Tabella 1: Campioni di cavalli, mulo e asini controllati e campioni positivi

	2007		2008	
	Esaminati	Positivi	Esaminati	Positivi
Cavallo	221916	477	242806	454
Mulo	1772	182	2634	277
Asino	9376	4	5463	9
Totale	233064	663	250903	740
	2009		2010	
	Esaminati	Positivi	Esaminati	Positivi
Cavallo	224318	219	234259	223
Mulo	2202	106	2784	130
Asino	11532	4	14695	16
Totale	238052	329	251738	369

Tabella 2: Prevalenze (%) per specie

	2007	2008	2009	2010
Cavallo	0,21	0,18	0,1	0,1
Mulo	10,27	10,52	4,81	4,7
Asino	0,04	0,16	0,06	0,11

Questo dato assume maggiore rilevanza se si considera che, nell'ambito di una progressiva tendenza alla riduzione della prevalenza (sia a livello nazionale che all'interno delle singole specie) nel periodo 2007-2010, l'eccesso di rischio (Odds Ratio) del mulo rimane costantemente superiore a 50 paragonato a quello del cavallo (considerato baseline = 1) (Tabella 3).

Tabella 3: Rischio per AIE (Odds Ratio) - mulo rispetto a cavallo

	2007	2008	2009	2010
Odds Ratio	53,1	62,6	51,8	51,4

Analizzando la distribuzione annuale delle prevalenze in base alla regione di provenienza, inoltre, si evidenzia una chiara concentrazione delle positività nelle regioni dell'Italia Centrale (Tabella 4). In particolare, risulta evidente un cluster di positività nelle regioni Abruzzo, Molise e Lazio.

Questa clusterizzazione del dato di prevalenza regionale si sovrappone al dato di prevalenza per specie. Per l'ibrido mulo, preso singolarmente, le prevalenze sono anch'esse

concentrate nelle regioni centrali, pur essendoci anche picchi di prevalenza in altre regioni: Marche (2007, 2008), Toscana (2007, 2008), Umbria (2007, 2008), Campania (2008, 2010). Considerato che nelle regioni sopra citate sono rappresentati oltre l'80% dei muli testati su base annuale si potrebbe desumere che la distribuzione territoriale delle prevalenze negli equidi sia correlata alla densità della popolazione di muli positivi su base regionale.

La stima dei dati sopraesposti risente di alcuni limiti e di criticità del PNS. Come già sottolineato i dati sono riferiti a campioni controllati: per le annualità 2007 e 2008, non è stato possibile infatti fare riferimento all'individuo, a causa dell'assenza di obbligo di identificazione univoca nell'ambito

Tabella 4: Prime sei regioni per valori di prevalenza negli anni 2007-2010

2007		2008	
Abruzzo	3,7	Abruzzo	3,27
Molise	1	Lazio	0,8
Lazio	0,47	Molise	0,62
Marche	0,37	Umbria	0,36
Calabria	0,31	Campania	0,24
Umbria	0,28	Marche	0,19
2009		2010	
Abruzzo	1,11	Abruzzo	1,22
Molise	0,96	Liguria	0,93
Lazio	0,44	Molise	0,29
Puglia	0,19	Puglia	0,27
Friuli v.g.	0,17	Campania	0,18
Umbria	0,17	Lazio	0,16

dei riuosi. Dal 2009, nonostante l'introduzione dell'obbligo di identificazione, una significativa proporzione di capi testati ne è comunque risultata priva, non a causa di una reale mancata identificazione ma dell'assenza della stessa sui verbali di prelievo. Per queste ragioni, venendo meno la possibilità di disporre di dati nelle diverse annualità sui singoli equidi non è stato possibile controllare eventuali distorsioni delle stime della prevalenza e calcolare puntualmente il numero di nuovi casi (incidenza). L'assenza dell'indispensabile supporto da parte di un'Anagrafe degli Equidi efficiente, inoltre, non ci permette di verificare l'effettiva percentuale della popolazione di equidi che è stata analizzata nelle diverse annualità.

Tuttavia, considerata la numerosità dei campioni testati rispetto al possibile modesto numero delle ripetizioni sui singoli capi, si ritiene che le stime ottenute siano rappresentative della situazione reale.

Le elevate prevalenze osservate nelle regioni centrali e, parallelamente, nel mulo, potrebbero essere ascrivibili ai seguenti fattori di rischio presenti singolarmente o associati:

- ampie aree di movimentazione per lavoro, con frequente convivenza allo stato brado di soggetti di differenti aziende;
- frequente compravendita di soggetti (muli) tra le diverse aziende;
- gestione igienico-sanitaria insufficiente, anche in relazione all'impiego rurale del mulo, soprattutto nelle aree montane delle regioni dell'Italia Centrale;
- difficoltà di esecuzione della sorveglianza su base annuale dei soggetti mantenuti in aree marginali;
- inadeguatezza delle misure di biosicurezza finalizzate al controllo dell'infezione e alla prevenzione del contagio;
- assenza di misure di biosicurezza in caso di mancato abbattimento dei soggetti positivi;

- abbondanza dei vettori nelle aree di allevamento e mantenimento e lavoro.

Il livello di prevalenza osservato, inoltre, lascerebbe prefigurare un possibile ruolo del mulo quale serbatoio dell'infezione, che merita un'indagine approfondita. Più in generale, alla luce di tutte le considerazioni sopra esposte, la coesistenza di muli e cavalli nella stessa struttura, a maggior ragione se a carattere "rurale", potrebbe costituire un rischio sostanziale di diffusione dell'AIE tra gli equidi. I valori di prevalenza nell'asino non sono valutabili da un punto di vista epidemiologico in considerazione del ridotto numero di campioni e dell'assenza di controlli ripetuti negli anni.

Altro fattore potenzialmente influente sul dato di prevalenza potrebbe essere la tecnica diagnostica utilizzata per lo screening. In Tabella 5 sono riportati i totali delle analisi effettuate dagli IZZSS delle regioni a più alta prevalenza.

Il dato si riferisce al numero totale di analisi, in quanto un singolo campione può essere sottoposto anche a diverse analisi in serie o in parallelo.

Tabella 5: Analisi effettuate dagli IZZSS del Lazio, Umbria, Abruzzo e Molise nel periodo 2007-2010 per tecnica

	AGID Coggins	AGID OIE	ELISA
IZSAM	883	46833	9870
IZSUM	15226	55683	0
IZSLT	142277	19727	107715

Da esperienze personali l'AGID – seppur tecnica riconosciuta ufficialmente per l'autorizzazione alla movimentazione -, risulta meno sensibile rispetto all'ELISA (2), ciò implica che qualora venga utilizzata come test di screening, una parte dei campioni risulti falsamente negativa; al contrario, utilizzando l'ELISA si mettono in evidenza molti campioni sospetti di infezione, anche se una parte di questi non verrà confermata. Queste caratteristiche dei due test potrebbero spiegare gli elementi messi in evidenza da un'analisi dei focolai nelle regioni dell'Italia centrale già citate nel 2011:

- in Abruzzo nel 12,8% (10/78) delle aziende già focolaio si sono riscontrati nuovi casi, in Molise nell'11,1% (1/9), nel Lazio nel 6,4% (3/47) mentre in Umbria nello 0%.
- il 35,7% (5/14) di queste aziende distano meno di 500 metri tra loro;
- nuovi focolai si sono verificati in aziende distanti meno di 10 km dalle prime nel 22,2% (7/36) dei casi, distanza modesta considerando gli ampi areali all'interno dei quali si muovono i soggetti per lavoro.

La presenza di nuovi soggetti positivi in un'azienda già focolaio, quindi, potrebbe essere dovuta ad una falsa negatività negli anni precedenti, in presenza di livelli anticorpali prossimi al limite di rilevanza dell'AGID. Le carenti misure di biosicurezza e la promiscuità potrebbero essere invece responsabili della diffusione all'interno dell'azienda o tra aziende vicine.

CONCLUSIONI

I dati ottenuti dai quattro anni di sorveglianza ci permettono di trarre alcune conclusioni:

- cavallo: la prevalenza a livello nazionale è molto bassa; inoltre è in costante diminuzione e clusterizzata nelle regioni centrali;
- mulo: la prevalenza è molto elevata, e, nonostante una diminuzione delle prevalenze nel corso degli anni, il rischio rispetto al cavallo si è mantenuto costante ed elevato. Il suo

eventuale ruolo come serbatoio necessita di ulteriori indagini. Con la ricerca IZSLT 07/08 si sta conducendo uno studio caso-controllo per identificare i fattori di rischio.

- sensibilità del sistema diagnostico: per aumentarne la sensibilità l'ELISA dovrebbe essere utilizzata come unico test di screening, riservando l'uso dell'AGID alla fase di conferma; inoltre nelle aree ad elevata prevalenza, nei focolai e nelle aziende prossime ad essi, i controlli dovrebbero essere intensificati, con cadenza semestrale, avendo cura di effettuare i prelievi prima dell'inizio e dopo la fine del periodo di attività vettoriale;
- flussi informativi ed informatici: si deve compilare

correttamente la scheda di prelievo, e trasmettere completamente e tempestivamente i flussi informatici. . Inoltre, non è più possibile derogare dal raggiungimento di una completa efficienza dell'Anagrafe Equina.

BIBLIOGRAFIA

1. Ordinanza 14 novembre (2006). Supplemento ordinario alla G.U. Serie generale n. 285 7-12-2006 e seguenti
2. Validazione di una C-Elisa per la ricerca degli anticorpi nei confronti della p26 del EIAV (2011) Autorino G.L. et al. IV Workshop Nazionale di Virologia Veterinaria 9-10/06/2011 Brescia pg 14

L'EMERGENZA DEGLI STAFILOCOCCHI METICILLINO-RESISTENTI IN AMBITO VETERINARIO: PROBLEMATICHE DI SANITÀ PUBBLICA E ANIMALE

Guardabassi Luca

Department of Disease Biology, Faculty of Life Science, University of Copenhagen, Danimarca

Key words: MRSA, MRSP, antibioticoresistenza

La meticillina è una penicillina modificata ad azione antistafilococcica che fu introdotta in medicina umana agli inizi degli anni '60 per contrastare l'emergenza della resistenza alla penicillina in *Staphylococcus aureus*. La resistenza alla meticillina fu osservata nel periodo immediatamente successivo all'introduzione del farmaco. Gli stafilococchi meticillino-resistenti tramite acquiscono per via orizzontale di un gene denominato *mecA* che codifica una Penicillin Binding Protein (PBP2a) con bassa affinità per i betalattamici e conferisce resistenza a tutti i betalattamici, cefalosporine incluse. Sebbene l'uso della meticillina sia stato gradualmente abbandonato in seguito alla scoperta delle cefalosporine, i ceppi di *S. aureus* caratterizzati da questo meccanismo di resistenza sono tuttora denominati come meticillino-resistenti (MRSA). Gli MRSA spesso sono associati a resistenze verso altre classi di antimicrobici utilizzate in alternativa ai betalattamici nel trattamento delle infezioni stafilococciche.

Gli MRSA sono stati a lungo confinati in ambiente ospedaliero e solo nell'ultimo decennio si sono diffusi prima nella società civile e poi nella popolazione animale. Infezioni umane causate dal clone suino di MRSA denominato come Sequence Type (ST)398 è stata riportata per la prima volta in Olanda nel 2004. Negli anni successivi MRSA ST398 si è diffuso su scala globale, prevalentemente nel suino ed in misura minore in altre specie animali (1). Più o meno nello stesso periodo la resistenza alla meticillina è emersa in altri lignaggi genetici di *S. aureus* di origine animale (e.g. MRSA ST9 nei suini in Asia) e in specie stafilococciche d'interesse veterinario, quali *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi* nei piccoli animali. In particolare, un clone meticillino-resistente di *S. pseudintermedius* (MRSP ST71) si è diffuso rapidamente nella popolazione canina in Europa ed attualmente è motivo di forte preoccupazione per via della sua elevata multiresistenza ai farmaci comunemente usati nella terapia delle infezioni causate da questo batterio (2).

Lo scopo di questa comunicazione è quello di raffrontare e discutere le problematiche di sanità pubblica e animale relative alla recente comparsa di MRSA ST398 nei suini e di MRSP ST71 nei piccoli animali.

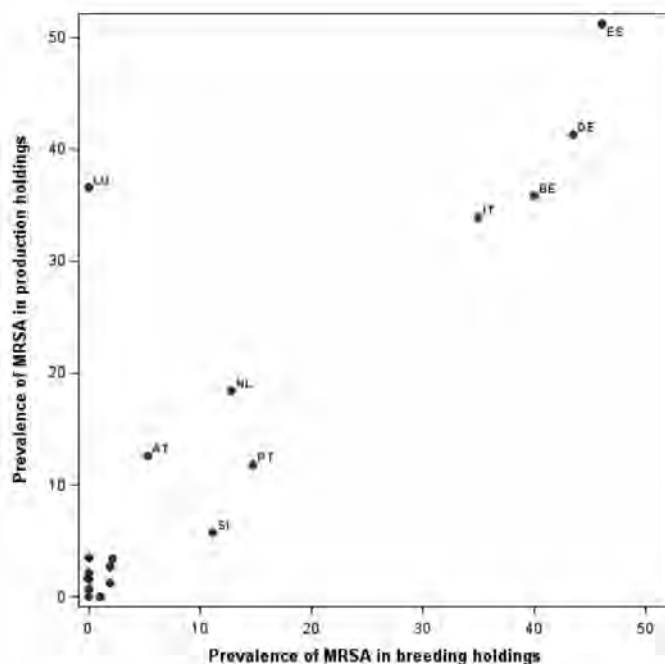
MRSA ST398 nei suini.

Come altri membri della specie, MRSA ST398 non è un agente patogeno importante nei suini. Generalmente l'infezione è subclinica e ha un impatto limitato sulla produttività. MRSA ST398 si diffonde verticalmente attraverso la piramide produttiva dell'industria suinicola. Un studio europeo condotto su 1.600 allevamenti da riproduzione e 3.473 allevamenti di suini da ingrasso in 26 nazioni ha dimostrato una forte associazione positiva tra la prevalenza di MRSA ST398 nei due tipi di allevamento (Figure 1)(3). Successivamente uno studio olandese ha evidenziato come il 79% delle aziende che hanno un fornitore MRSA-positivo siano anch'esse positive, sottolineando l'importanza del commercio di suini contaminati nella trasmissione di MRSA ST398 tra aziende (4).

MRSA ST398 è resistente alle tetracicline, che sono fra gli antibiotici più utilizzati nella produzione del suino. Quindi l'uso di

tetracicline e di zinco antibiotici potrebbe favorire la trasmissione di questo batterio fra i suini all'interno dell'azienda. Sebbene sia stato isolato da vari alimenti di origine animale, non ci sono prove che l'assunzione di alimenti contaminati possa aumentare il rischio di essere infetti o di diventare portatori sani. La trasmissione all'uomo avviene attraverso il contatto diretto con animali positivi o indirettamente tramite esposizione all'ambiente di aziende contaminate. Elevate percentuali di colonizzazione sono state riscontrate negli allevatori e nei veterinari, fra i quali sono stati riportati numerose casi d'infezione, soprattutto in Olanda (1-2).

Figura 1. Associazione positiva fra la prevalenza di MRSA ST398 in allevamenti di suini da riproduzione ed in allevamenti di suini da ingrasso (EFSA 2008).



La trasmissione secondaria a persone che non lavorano a contatto con i suini sembra essere poco frequente. Il flusso limitato di MRSA ST398 dagli allevamenti alla comunità suggerisce che questo stafilococco di origine suina non è adattato all'ospite umano. Rispetto agli MRSA di origine umana è meno resistente ai farmaci non-betalattamici e non contiene alcuni fattori di virulenza come la leucocidina Pantone-Valentine (PVL), una tossina ritenuta responsabile di necrosi dei tessuti.

MRSP ST71 nei cani.

La resistenza alla meticillina è emersa in *S. pseudintermedius* quasi 40 anni dopo il primo rilevamento di MRSA nell'uomo. I primi casi d'infezione da MRSP nel cane e nell'uomo furono riportati negli Stati Uniti nel 1999. Da allora la prevalenza di MRSP è aumentata esponenzialmente su scala globale. Secondo dati

pubblicati negli ultimi due anni la prevalenza fra isolati clinici di *S. pseudintermedius* oscilla fra il 4 ed il 66% a seconda della nazione (Tabella 1). I due cloni responsabili della diffusione di MRSP in Europa e in America del Nord sono stati denominati ST71 e ST68, rispettivamente, sulla base del metodo Multi Locus Sequence Typing (MLST).

Tabella 1. Prevalenza di MRSP in *S. pseudintermedius* isolati da campioni diagnostici prelevati da piccoli animali.

Autore	Anno	No. ceppi	Paese	Prevalenza
Kawakami et al.	2010	170	Giappone	66%
Yoo et al.	2010	74	Corea	34%
Bemis et al.	2009	404	USA	30%
De Lucia et al.	2010	48	Italia	21%
Penna	2010	35	Brasile	16%
Chrobak et al.	2011	221	Polonia	12%
Ruscher et al.	2009	821	Germania	6%
SVARM	2011	444	Svezia	4%

Il clone epidemico europeo MRSP ST71 è significativamente più resistente ai farmaci non-betalattamici rispetto ai ceppi meticillino-sensibili ma anche rispetto ad altri lignaggi genetici di MRSP (Table 2). Nella migliore delle ipotesi, le opzioni terapeutiche per la cura d'infezioni causate da questo clone sono limitate ad antimicrobici che hanno varie controindicazioni nel cane, come le tetracicline, il cloramfenicolo, la rifampicina e la nitrofurantoina. Questa situazione ha indotto alcuni veterinari ad utilizzare antibiotici non autorizzati per uso veterinario e classificati come farmaci di ultima fascia nella terapia di gravi infezioni batteriche nosocomiali, quali la vancomicina ed il linezolid.

Tabella 2. Resistenza ai farmaci non-betalattamici in ceppi meticillino-resistenti (MRSP) e meticillino-sensibili (MSSP) di *S. pseudintermedius* isolati da campioni clinici.

Autore	No. ceppi	Clinda	FQs	S-TMP	Tet	Gen
MRSP ST71						
Ruscher et al. 2009	76	99%	99%	100%	90%	99%
Perreten et al. 2009	76	97%	100%	100%	68%	70%
Chrobak et al. 2011	23	96%	96%	N.D.	N.D.	96%
Other MRSP						
Morris et al. 2006	57	35%	55%	68%	42%	81%
Bemis et al. 2009	90	91%	91%	97%	95%	33%
Perreten et al. 2009	27	67%	56%	41%	74%	56%
MSSP						
Pedersen et al. 2007	201	27%	1%	3%	24%	N.D.
Bemis et al. 2009	204	12%	4%	20%	33%	5%
Chrobak et al. 2011	56	27%	2%	N.D.	N.D.	10%
Rubin et al. 2011	60	13%	0%	5%	34%	0%

Un numero crescente di studi ha rilevato la presenza di MRSP in veterinari e proprietari di piccoli animali. Sebbene l'incidenza delle infezioni da MRSP sia ancora molto bassa nell'uomo, il potenziale zoonotico di questo stafilococco patogeno deve essere valutata con molta attenzione, anche in considerazione della sua comparsa molto recente. La frequenza di infezioni umane potrebbe essere sottovalutata in quanto esiste un elevato rischio di errore nell'identificazione di MRSP nei laboratori diagnostici di medicina umana. Infatti *S. pseudintermedius* è generalmente negativo alla prova della coagulasi su vetrino, la cefoxitina non è un buon rilevatore della meticillino resistenza in questa specie ed i breakpoints non coincidono con quelli utilizzati per l'iden-

tificazione degli MRSA. Indipendentemente da potenziali rischi zoonotici, veterinari e proprietari di piccoli animali possono fungere da vettori per la trasmissione di MRSP ST71 da animale ad animale. Questo elemento è particolarmente importante dal punto di vista epidemiologico visto che MRSP ST71 ha una notevole predisposizione alla contaminazione degli ambienti clinici e alle infezioni nosocomiali.

CONCLUSIONI

I dati scientifici attualmente a disposizione indicano che MRSA ST398 è un problema di sanità pubblica, mentre MRSP ST71 è principalmente un problema di sanità animale. I rischi zoonotici associati a MRSA ST398 sembrano essere confinati a persone che vivono o lavorano in contatto con i suini o con altri tipi di animali da reddito. Inoltre il grado di antibioticoresistenza e virulenza è inferiore a quello degli MRSA di origine umana. Allo stato attuale, MRSA ST398 è particolarmente temuto in paesi caratterizzati da una bassa prevalenza di MRSA nell'uomo ed da una elevata produzione di suini, come l'Olanda e la Danimarca. Un eventuale aumento della prevalenza di MRSA nella popolazione a causa della introduzione di questo stafilococco suino metterebbe a serio rischio la politica "search and destroy" adottata da questi paesi, con gravi ripercussioni economiche sul sistema sanitario nazionale.

Le problematiche di sanità pubblica e animale relative alla comparsa di MRSP ST71 nei piccoli animali sono completamente diverse. Dal punto di vista della salute animale, questo stafilococco multi-resistente rappresenta il più grave problema di antibioticoresistenza mai osservato nella storia della medicina veterinaria. Data la sua crescente diffusione e le difficoltà intrinseche nella scelta di una terapia antibiotica efficace e sicura, MRSP ST71 è da considerarsi una vera e propria minaccia alla salute dei piccoli animali. L'uso diffuso di cefalosporine e fluorochinoloni nei piccoli animali è destinato a favorire nei prossimi anni una ulteriore diffusione di MRSP ST71, con conseguenze che potrebbero risultare devastanti sulla salute di questi animali. Diverse sono anche le misure necessarie al controllo ed alla prevenzione di questi due tipi di stafilococchi meticillino-resistenti d'interesse veterinario. Misure di igiene e di biosicurezza negli allevamenti suini sono utili a minimizzare il rischio che MRSA ST398 si trasmetta agli allevatori e tramite essi si propaghi alla comunità e agli ospedali. Il controllo e la prevenzione di MRSP ST71 sono legati a vari fattori quali i) l'implementazione di linee guida nazionali per l'uso razionale e responsabile dell'antibiototerapia nei piccoli animali; ii) l'adozione di programmi per il controllo dell'infezione nelle strutture veterinarie; ed infine iii) lo sviluppo e l'utilizzazione di prodotti antimicrobici alternativi, quali shampoo ed altri prodotti antisettici ad uso topico. Sebbene i rischi per la salute pubblica appaiano essere limitati allo stato attuale delle nostre conoscenze, veterinari ed proprietari di piccoli animali dovrebbero essere sensibilizzati circa il potenziale rischio zoonotico associato alla diffusione di MRSP ST71. Inoltre il personale presso laboratori diagnostici di medicina umana dovrebbe essere addestrato a identificare i ceppi MRSP correttamente al fine di attuare una sorveglianza epidemiologica nell'uomo.

RIFERIMENTI

1. Smith and Pearson 2011. Vector Borne Zoonotic Dis. 11, 327-339.
3. Weese and van Duikeren 2010. Veterinary Microbiology 140, 418-419.
4. European Food Safety Authority (EFSA) 2008. (<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1597.pdf>)
5. Broens et al. 2010. Prev. Vet. Med. 98, 182-189.

INDAGINE PER *S. AUREUS* E *S. AUREUS* METICILLINO-RESISTENTE (MRSA) IN LATTE CRUDO DI MASSA BOVINO DI ALLEVAMENTI DELLA REGIONE LAZIO

Giacinti G., Tammaro A., Sagrafoli D., Proietti A., Veschetti M.C., Bicocchi R., Franco A., Carratù D., Battisti A., Cordaro G., Amatiste S.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle regioni Lazio e Toscana; CRN-Antibioticoresistenza

Key words: *Methicillin resistant Staphylococcus aureus*, survey, bulk tank milk

SUMMARY

Staphylococcus aureus (*S. aureus*), one of the most important causative factor of mastitis in dairy cattle, is commonly found in bulk tank milk from farms with infected cows. However a little evidence of *Methicillin resistant S. aureus* (MRSA) has been detected in bulk tank milk. The objective of the study was to survey dairy cattle herds of the Latium region both for *S. aureus* and MRSA from 399 bulk tank milk samples by using non-selective and selective culture methods. A total of 190 samples (47,6%) positive for *S. aureus* were plated on BBL CHROMagar™ MRSA after subculture on MH Broth 6,5% NaCl. After 24 h of incubation, 19 samples resulted suspected of MRSA, and 10 (5,3%) of all samples harboured isolates that were confirmed as phenotypically resistant to beta-lactams and positive for the *mecA* gene by PCR. The use of a selective medium for MRSA such as CHROMagar™ resulted useful as a screening tool for bulk tank milk samples.

INTRODUZIONE

Staphylococcus aureus meticillino-resistente (MRSA) è tra le cause primarie di infezioni nosocomiali, mostrando una particolare rapidità diffusiva sia in ambiente ospedaliero che nella comunità.

Alcuni cloni di MRSA si sono diffusi tra gli allevamenti di animali zootecnici e negli animali da compagnia (11, 7), rappresentando un rischio emergente per la salute pubblica, nonostante non se ne conosca ancora il potenziale impatto nel campo della sicurezza alimentare. La prima segnalazione di MRSA, in ambito veterinario, risale al 1972 (3), a seguito di controlli su campioni di latte prodotto da bovine con mastite. Il fenomeno, in continuo aumento, è stato considerato associato alla pressione selettiva esercitata dall'ampio impiego di antibiotici intramammarici usati in questa specie.

Recentemente in Italia sono stati isolati numerosi ceppi di MRSA da campioni di latte bovino e da prodotti lattiero-caseari (6, 1). Alcuni autori (8) inoltre hanno isolato MRSA in diversi allevamenti da casi di mastite bovina anche se la prevalenza di bovine infette è risultata essere molto bassa negli allevamenti controllati (8).

S. aureus risulta il principale agente di infezione intramammaria (4) nella specie bovina ed è comunemente presente nel latte di massa di allevamenti con bovine infette (5). L'enumerazione di *S. aureus* nel latte di massa viene infatti impiegata per la valutazione del livello d'infezione intra-allevamento (2). Tuttavia l'isolamento di MRSA da questa matrice può trovare difficoltà per un numero esiguo di ufc/ml, per la co-presenza di ceppi *S. aureus* meticillino-sensibili (MSSA) e di stafilococchi coagulasi negativi meticillino-resistenti (10).

Negli ultimi anni sono stati commercializzati terreni cromogeni che consentono la rilevazione di MRSA, talvolta utilizzati nella routine senza test di conferma, anche in campioni contaminati (9), trovando principale impiego in campioni clinici umani, mentre scarso è il loro utilizzo in campioni di origine animale e in particolare nel latte di massa.

Scopo del lavoro è stato quello di effettuare una indagine per

valutare la diffusione di MSSA ed MRSA nel latte crudo di massa di allevamenti di bovine della regione Lazio, attraverso l'utilizzo di protocolli colturali non-selettivi e selettivi.

MATERIALI E METODI

Sono stati esaminati 399 campioni di latte di massa bovino appartenenti ad altrettanti allevamenti della regione Lazio, per la ricerca quantitativa di *S. aureus* e per la presenza di MRSA nel periodo maggio-luglio 2011. I campioni di latte, prelevati da diverse Cooperative di Produttori, rientravano nell'ambito dei controlli effettuati per il pagamento latte secondo qualità.

Entro 24 ore dal prelievo è stata eseguita la semina in terreno Baird Parker + Rabbit Plasma Fibrinogen (BP-RPF) secondo la ISO 6888-1:1999 per la ricerca quantitativa di *S. aureus* e la semina di 1 ml di latte in Muller-Hinton Broth al 6,5% di NaCl. Dopo 24 ore d'incubazione a 37°C, 10 µl delle brode colture corrispondenti ai campioni risultati positivi per *S. aureus* con il terreno BP-RPF, sono stati seminati per isolamento su terreno cromogeno CHROMagar™ MRSA. Il terreno è stato incubato a 37°C in aerobiosi con lettura delle piastre dopo 24 ore, valutando la presenza di colonie tipiche MRSA; in assenza di crescita o di colorazione le piastre sono state incubate per altre 24 ore. Secondo le indicazioni della casa produttrice le colonie che appaiono di colore rosa-malva a 24 ore sono riferibili a MRSA, senza ulteriori conferme. Colonie rosa-malva che appaiono dopo 48 ore devono essere sottoposte al test della coagulasi. MSSA risulterebbero inibiti mentre altri microrganismi possono sviluppare con colonie incolore o blu.

Tutte le colonie tipiche (rosa-malva), sviluppate entro 24 e 48 ore d'incubazione, sono state sottoposte al test della coagulasi, alla valutazione dell'emolisi e alla verifica fenotipica della meticillino-resistenza mediante test di diffusione in agar, secondo le standard CLSI, e alla conferma della presenza del gene *mecA* mediante PCR.

RISULTATI

La presenza di *S. aureus* è risultata in 190 campioni (47,6%, 95% C. I. 42,7-52,5%), con un range di concentrazione tra 10¹ e 10³ ufc/ml (Tabella 1). La crescita di colonie tipiche su terreno cromogeno è stata osservata in 19 campioni dopo 24 ore d'incubazione e in altri 11 campioni dopo 48 ore. Tutte le colonie tipiche cresciute a 24 e 48 ore sono state confermate fenotipicamente come *S. aureus*. I campioni risultati sospetti per MRSA con il terreno cromogeno sono stati 19 (10%) e 30 (15,8%), rispettivamente a 24 e 48 h di incubazione. Le indagini fenotipiche e molecolari hanno confermato la presenza di MRSA in 10 campioni di 10 diverse aziende, con una prevalenza sul totale delle aziende esaminate del 2,5% (95% C. I. 1,0 - 4,0%). I campioni falsi positivi sono risultati 9 a 24 h e 20 a 48 h. I campioni di latte crudo di massa positivi per MRSA hanno rappresentato il 5,3%, (95% C. I. 2,1-8,4%) dei campioni complessivamente positivi per *S. aureus*. La distribuzione delle aziende MRSA in funzione della concentrazione di *S. aureus* (ufc/ml) è risultata omogenea nelle classi centrali (Tabella 1).

Tabella 1. Distribuzione delle aziende positive a MRSA e MSSA in funzione delle ufc/ml di *S.aureus*

ufc/ml di <i>S.aureus</i>	N°aziende <i>S.aureus</i> +	N°aziende MRSA+
<50	52	0
50-200	49	3
201-500	39	3
501-1000	32	3
>1000	18	1
Totale	190	10

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti hanno permesso di evidenziare una elevata diffusione di *S. aureus* (52,6%) nel latte crudo di massa proveniente da allevamenti della regione Lazio, confermando un dato già rilevato da studi precedenti (4). La presenza di MRSA è stata rilevata nel 2,5% degli allevamenti investigati, e nel 5,3% delle aziende positive per *S. aureus*.

La prevalenza di MRSA da noi riscontrata non è facilmente confrontabile con altri dati di letteratura, e comunque risulta inferiore a quanto osservato in altri studi (8, 1), in cui tuttavia i campioni erano prevalentemente di capezzolo. In una recente indagine condotta negli USA (10) in 542 allevamenti di bovini da latte, nessun MRSA è stato isolato mediante semina diretta dei campioni di latte di massa su terreno cromogeno.

La percentuale di falsi positivi (66,7%) da noi osservata è risultata più elevata di quanto riportato da Van-Vaerenbergh et al (9) in campioni clinici umani, in cui la percentuale di falsi positivi è stata del 39%.

I terreni cromogeni per MRSA e in particolare il CHROMAgar™ MRSA sono impiegati prevalentemente per lo screening di campioni clinici umani, le interazioni di questo terreno con matrici complesse come il latte non ci risultano essere state studiate. Tuttavia in campioni come il latte di massa, in cui possono coesistere MRSA, MSSA e stafilococchi coagulasi negativi *mecA*, l'utilizzo di un terreno selettivo cromogeno può facilitare il rilevamento di allevamenti con presenza di MRSA.

In conclusione da questi dati emerge la necessità di un monitoraggio periodico del latte di massa al fine di valutare la presenza di *S. aureus*, di disporre di stime preliminari sui livelli di prevalenza in allevamento, e di valutare presenza e trend di diffusione di MRSA negli allevamenti da latte.

I risultati ottenuti indicano che anche il terreno CHROMAgar™ MRSA può rappresentare un possibile strumento di screening nella routine microbiologica dei campioni di latte di massa, con l'accortezza che a valle si disponga di robusti metodi di conferma per MRSA degli isolati. Si ritengono tuttavia necessari ulteriori studi per valutarne le caratteristiche di performance con campioni di origine animale.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Benedetti V., Cremonesi P., Ferrari S., Castiglioni B., Fabbì M., Vicari N., Garbarono C., Battisti A., Franco A., Feltrin F., Luini M., 2010. *S.aureus* meticillino-resistente (MRSA) da campioni di latte bovino. Large Animal Review 16:67-70
- 2- Bertocchi L., Bolzoni G., Zanardi G., Nassuato C., Bonometti G. Benicchio S., Varisco G. Conteggio delle unità formanti colonia di *Staphylococcus aureus* nel latte di massa come dato predittivo del livello d'infezione intra-allevamento. XII Congresso Nazionale SIDILV. 27-29 Ottobre 2010.
- 3- Devriese L.A., Vandamme L.R., Fameree L., 1972. Methicillin (cloxacillin)-resistant *S.aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. Zentralblatt für Veterinärmedizin B 19,598-605.
- 4- Giacinti G., Amatiste S., Tammaro A., Franco A., Di Matteo P., Cordaro J. Sorbara L., Rosati R. Sensibilità antimicrobica in vitro di batteri isolati da campioni di latte di capezzolo bovino. 6 Congresso Nazionale del Mastitis Council 18-20 febbraio 2008.
- 5- Normanno A, Celano G.V. et al.2005. Coagulase-positive Staphylococci and *S .aureus* in food products marketed in Italy. Journal of Food Microb.98 73-79;
- 6- Normanno G., Corrente M., Calandra L, Dambrosio A., Quaglia Nc., Parisi A., Greco G., Bellacicco AL., Virgilio S., Celano GV., 2007. *S.aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. Int.J.Food Microbiol., 117:219-222
- 7- Pan A., Battisti A., Zoncada A., Bernieri F., Boldini M., Franco A., Giorni M., Iurescia M., Lorenzotti S., Martinetti M., Monaci M., Pantosti A., 2009. Community-acquired Methicillin Resistant *S.aureus* ST398 infection, Italy. Emerging Infections Diseases. Vol, 15
- 8- Vanderhaeghen W., Cepentier T., Adriaensen C, Vicca J., Hermans K., Butaye P., 2010. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA)ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian Cows
- 9- Van-Vaerenbergh KV., Cartuyvels R., Coppens G., Frans J., Van den Abele AM., De Beenhouwer H. 2010. Performance of a new Chromogenic Medium, BBL CHROMagar MRSA II (BD), for Detection of Methicillin-Resistant *S. aureus* in Screening Samples. J. of Clinical Microbiology, 1450-1451
- 10- Virgin J.E., Van Slyke T.M., Lombard J.E., Zadoks R.N., 2009. Short communication: Methicillin-resistant *S.aureus* detection in US bulk tank milk
- 11- Walther B., Friedrich A.W., Brunneberg L., Wieler L.H., Lubke-Becker A.. 2006. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in veterinary medicine: a new emerging pathogen. Berlin und Munchener Tierärztliche Wochenschrift, vol 119,n°5-6, pp222-232.

INDAGINE SULLA PRESENZA DI STAPHYLOCOCCUS AUREUS E DI MRSA NEL LATTE DI MASSA DELLE AZIENDE BOVINE DELLA PROVINCIA DI LODI

Pozzi F.¹, Vezzoli F.¹, Nassuato C.², Franco A.³, Ianzano A.³, Battisti A.³, Luini M.¹

¹IZSLER - Sezione di Lodi, ²IZSLER – Sorveglianza Epidemiologica Lombardia, ³IZSLT – CRN per l'Antibioticoresistenza

Key Words: *S. aureus*, bovino, MRSA

SUMMARY

MRSA were recently detected in bovine milk in several European countries. The aim of this study was to evaluate the prevalence of *S. aureus* and MRSA (meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*) in the bulk tank milk of dairy cattle of an area of the Po Valley. We analyzed samples from 311 farms and 95 were positive for *S. aureus* (30,5%). In our study 26% of farms produced milk with low levels of *S. aureus* (<50 UFC/ml), while high levels (> 400 UFC/ml) are reported in 36% of cases. 15 samples were positive for MRSA (4.8%) and two of them were grouped within the Clonal Complex 398.

INTRODUZIONE

MRSA (*Meticillin Resistant Staphylococcus Aureus*) è emerso come problema negli anni '70 negli USA ed è diventato un problema mondiale come responsabile di episodi di infezione nosocomiale (*Hospital Acquired MRSA*, HA-MRSA), ma anche in soggetti sani, senza una correlazione epidemiologica con il ricovero ospedaliero (*Community Associated MRSA*, CA-MRSA). Ricerche effettuate negli ultimi anni hanno evidenziato che ceppi di MRSA possono essere responsabili di infezioni in varie specie di animali da compagnia e d'allevamento (suini, bovini, ovini, specie aviarie, equini) e sembrano aver trovato, nella specie suina in particolare, un *reservoir* di particolare rilevanza per la presenza di ceppi appartenenti al complesso clonale CC398, il principale tra i *Livestock Associated MRSA* (LA-MRSA). Questi agenti sono in grado di colonizzare attivamente e produrre infezione anche negli esseri umani e pertanto LA-MRSA è a tutti gli effetti un agente zoonotico emergente, specialmente in alcune categorie professionali (allevatori e relativi familiari, personale di allevamenti e macelli, veterinari) (4,10). Anche matrici alimentari, come per esempio vari tipi di formaggio e carni, sono risultate contaminate da MRSA e vanno tenute in considerazione nella trasmissione all'uomo (5,9). Studi effettuati su campioni di latte mastitico in Belgio (12), in Germania (7) e in Italia (2) hanno portato all'isolamento di numerosi ceppi di MRSA, evidenziandone la presenza nel latte bovino e nei suoi derivati. I ceppi erano prevalentemente riferibili a ST398. Negli Stati Uniti nel corso di un'ampia indagine sul latte di massa il 3.2% dei campioni risultava positivo per il gene *mecA*, ma nessun ceppo di MRSA è stato isolato (11). Il presente lavoro descrive l'isolamento di *S. aureus* e la genotipizzazione di ceppi di MRSA dai campioni di latte di massa delle aziende bovine della Provincia di Lodi.

MATERIALI E METODI

Campioni – Sono stati analizzati campioni di latte di massa bovino provenienti da 311 sul totale delle 351 aziende da latte della Provincia di Lodi. Il prelievo è stato effettuato in contenitori sterili dopo agitazione e raffreddamento della massa a fine mungitura ed è stato conservato refrigerato a 4-7°C fino alla consegna al laboratorio.

Esami batteriologici – Prima della semina, i campioni sono stati tenuti per 1-2 ore a temperatura ambiente e agitati al fine di disperdere il grasso e gli eventuali microrganismi presenti. La semina è stata comunque effettuata entro 24 ore dal prelievo. Il latte

è stato seminato direttamente in quantità di 100 µl tal quale e della diluizione 1:10 su terreno Baird Parker - Rabbit Plasma Fibrinogen agar (BP-RPF). Dopo 48 ore di incubazione a 37°C, dai campioni di latte risultati positivi (sviluppo di colonie con caratteristico alone di opacamento per coagulazione del plasma) sono state scelte 4 o 5 colonie per conferma mediante test della coagulasi in provetta e crescita su Mannitol Salt Agar (MSA). Le colonie coagulasi positive e mannitol positive sono state considerate *S. aureus*. Il conteggio delle colonie in UFC è stato effettuato con un calcolo della media ponderata delle due successive diluizioni.

Meticillino-resistenza – Analisi microbiologiche – Per ciascun campione, fino a 5 colonie riferibili a *Staphylococcus aureus* sono state sottoposte a screening per la meticillino-resistenza mediante test di sensibilità all'oxacillina secondo Kirby Bauer utilizzando dischetti da un 1 mcg. Per aloni di inibizione > a 12 mm i ceppi sono stati considerati sensibili, per aloni compresi fra 12 e 10 mm intermedi e ≤ di 10 mm resistenti. **Analisi molecolari** – Dai ceppi risultati resistenti o intermedi all'oxacillina è stato estratto il DNA utilizzando il kit "Dneasy Blood and Tissue" (Qiagen) e successivamente è stato amplificato mediante una reazione di multiplex PCR per l'identificazione simultanea dei geni *nuc* e *mecA*, utilizzando primers riportati in letteratura (3,8) e l'utilizzo di DNA polimerasi HotStarTaq (Qiagen). Il ciclo di amplificazione prevede una denaturazione iniziale a 95°C per 15 minuti, seguita da 30 cicli di 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 56°C e 1 minuto a 72°C e un'estensione finale a 72°C per 7 minuti.

Genotipizzazione – Gli isolati MRSA sono stati genotipizzati per MLST (Multi Locus Sequence Typing) secondo quanto riportato in letteratura (6).

RISULTATI

Esami batteriologici – Sul totale dei 311 campioni, 95 sono risultati positivi per *S. aureus* (30,5%; I.C. 95%: 28,7-32,5) ed i rimanenti 216 negativi (<10 UFC/ml). In particolare 25 presentavano una conta compresa fra 10 e 50 UFC/ml, 9 compresa fra 51 e 100, 13 compresa fra 101 e 200, 9 fra 201 e 400, 17 fra 401 e 800 e 17 una conta > 800 UFC/ml. In 5 campioni è stata dimostrata la presenza di *S. aureus*, ma non è stata eseguita la conta (Tabella 1).

Meticillino-resistenza – Utilizzando il metodo di diffusione in agar, sul totale dei 95 ceppi di *Staphylococcus aureus* isolati, 27 sono risultati resistenti (R) o intermedi (I) all'oxacillina. La multiplex PCR eseguita sui DNA estratti ha confermato in tutti la presenza del gene *nuc* e ha evidenziato 15 ceppi *mecA* positivi pari al 16% dei ceppi di *S. aureus* isolati ed al 4,8% (I.C. 95%: 4,0-5,8) dei campioni di latte di massa esaminati (Tabella1). La localizzazione nell'ambito dell'area geografica considerata delle aziende positive nel latte di massa per *S. aureus* e per MRSA è rappresentata nella figura 1.

Caratterizzazione molecolare – Due isolati su 15 appartenevano al Complesso Clonale 398.

DISCUSSIONE

In questo lavoro si documenta la presenza di *S. aureus* in 93 campioni di latte di massa di altrettante aziende del territorio considerato (30,5%). Sugli stessi campioni è stata eseguita la conta

di *S. aureus* e questo dato si può considerare predittivo dei livelli di prevalenza di vacche con infezione mammaria presenti nella mandria (National Mastitis Council). La conta ha evidenziato che solo il 26% delle aziende presentava un livello basso (<50 UFC/ml) e quindi con infezione probabilmente sotto controllo, mentre nel 36% dei casi sono state rilevate cariche anche molto elevate (> 400 UFC/ml), limite che suggerisce una probabile alta prevalenza di vacche infette.

MRSA sono stati isolati nel 4.8% dei campioni/aziende esaminati, una percentuale che appare di per sé rilevante, anche se non paragonabile a quella ottenuta in altre indagini sul latte di massa, salvo quella condotta negli USA, che non ha evidenziato MRSA nei 218 campioni positivi per *S.aureus* (11). Osservando le conte di *S. aureus* e i rispettivi isolamenti di MRSA, sembrerebbe che la presenza di MRSA non sia associata ad una conta di *S. aureus* elevata, espressione di una maggiore diffusione dell'infezione in azienda. La caratterizzazione genotipica ha consentito di individuare 2 isolati appartenenti al CC 398 ed i rimanenti (dati preliminari) raggruppabili per la maggior parte in complessi clonali associati a specie zootecniche, compresa quella bovina, e già segnalati in Italia (1). Al momento comunque non si dispone di informazioni sufficienti per ipotizzare maggiore o minore virulenza di MRSA rispetto ad MSSA nelle specie zootecniche.

Relativamente alla meticillino-resistenza degli isolati sarebbe da approfondire il meccanismo della resistenza microbiologica all'oxacillina dei ceppi *mecA* negativi.

Il nostro lavoro conferma le recenti indagini che indicano il bovino come serbatoio di MRSA anche in alcune aree del territorio italiano ad alta vocazione per l'allevamento bovino da latte, analogamente a quanto già osservato in altre aree d'Europa e sottolineano la particolare importanza che assume il controllo delle mastiti bovine causate da questi ceppi in funzione della possibile contaminazione del latte (vedi consumi di latte crudo al distributore) e dei prodotti lattiero-caseari.

BIBLIOGRAFIA

- Battisti A, Franco A, Merialdi G, Hasman H, Iurescia M, Lorenzetti R, Feltrin F, Zini M, Aarestrup FM (2009) Heterogeneity among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Italian pig finishing holdings. *Vet Microbiol.* 2010 19;142(3-4):361-6.
- Benedetti V, Cremonesi P, Ferrari S, Castiglioni B, Fabbri M, Vicari N, Garbarino G, Battisti A, Franco A, Feltrin F, Luini M (2010). *Staphylococcus aureus* meticillino-resistenti (MRSA) da campioni di latte bovino. *Large Animal Review*, 16:67-70.
- Cremonesi P, Luzzana M, Brasca M, Morandi S, Iodi R, Vimercati C, Agnellini D, Caramenti G, Moroni P, Castiglioni B (2005). Development of a multiplex PCR assay for the identification of staphylococcus aureus enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. *Mol. Cell. Probes*, 19:299-305.
- Cuny C, Friedrich A, Kozytska S, Leyer F, Nübel U, Ohlsen K, Strommenger B, Walther B, Wieler L, Witte W (2010). Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. *International Journal of Medical Microbiology*, 300:109-117
- de Boer E, Zwartkruis-Nahuis JTM, Wit B, Huijsdens XW, de Neeling AJ, Bosch T, van Oosterom RAA, Vila A, Heuvelink AE (2009). Prevalence of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *International Journal of Food Microbiology*, 134:52-56.
- Enright M.C., Day N.P., Davies C.E., Peacock S.J., Spratt B.G., 2000, Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*, *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 1008-1015.
- Fessler A, Scott C, Kadlec K, Ehrcht R, Monecke S, Shhwartz S (2010). Characterization of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. *J Antimicrob Chemoter.* [Epub ahead of print].
- McClure JA, Conly JM, Lau V, Elsayed S, Louie T, Hutchins W, Zhang K (2006). Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Pantone-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from resistant staphylococci. *J. Clin. Microbiol.*, 44:1141-1144.
- Normanno G, Corrente M, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Parisi A, Greco G, Bellacicco AL, Virglio AS, Celano GV (2007). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 117:219-222.
- Smith TC, Pearson N (2011). The emergence of *Staphylococcus aureus* ST398. *Vector-Borne and zoonotic disease*, vol 11, No 4.
- Virgin JE, Van Slyke TM, Lombard JE, Zadokst RN (2009). Short communication: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* detection in US bulk tank milk. *J Dairy Sci*, 92:4988-4991.
- Wanderhaeghen, Cerpentier T, Adriaensen C, Vicca J, Hermans K, Butaye P (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. *Vet Microbiol.* [Epub ahead of print].

Campioni		Meticillino-resistenza			
		Sens. Oxacillina			<i>mecA</i> +
<i>S. aureus</i> UFC/ml	N.	S	I	R	
< 10	216	-	-	-	-
10 - 50	25	19	0	6	5
51 - 100	9	4	1	4	3
101 - 200	13	7	0	6	2
201 - 400	9	6	0	3	2
401 - 800	17	13	0	4	1
> 800	17	15	1	1	1
nd	5	4	0	1	1
Totale	311				
Totale positivi	95 (31%)	68	2	25	15 (4.8%)

Tabella 1 – Campioni di latte di massa esaminati, Conta Batterica di *S. aureus* e meticillino-resistenza (sensibilità all'Oxacillina e presenza del gene *mecA*).

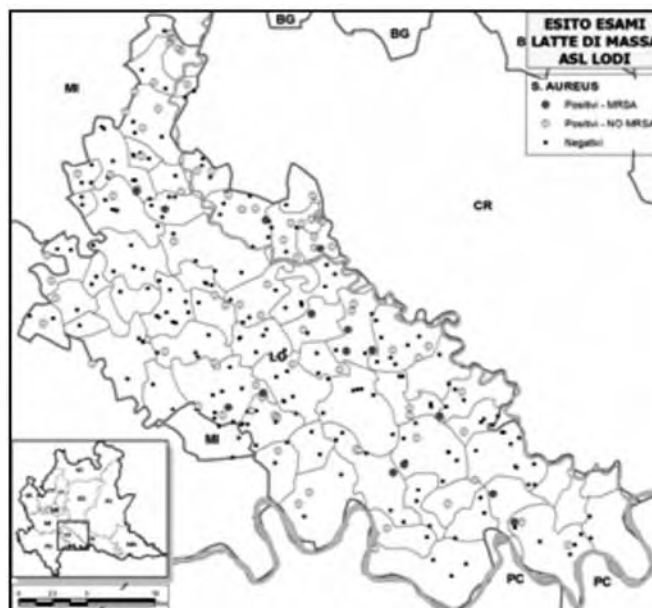


Figura 1 – Localizzazione nel territorio delle aziende positive per *S. aureus* e per MRSA nel latte di massa.

Le ricerche sono state eseguite nell'ambito del Progetto Di Ricerca Corrente Ministero della Salute PRC2008/08-IZSLER.

STUDIO LONGITUDINALE SULLA COLONIZZAZIONE NASALE DA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METICILLINO RESISTENTE (MRSA) IN UN ALLEVAMENTO SUINO A CICLO CHIUSO

Meriardi G.¹, Galletti E.¹, Granito G.², Franco A.³, Battisti A.³, Martelli P.³

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna; ² Veterinario libero professionista; ³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana; ⁴ Dipartimento di salute Animale-Università degli Studi di Parma

Key words: methicillin resistant *Staphylococcus aureus*; antimicrobial resistance; epidemiology

SUMMARY. Little is known about age-related changes in MRSA colonization in pigs. In order to contribute to better understanding of this issue a longitudinal study has been planned and conducted. Nasal swabs were collected from 30 gestating sows. 60 piglets (10 from 6 out of the 30 sows) were individually ear tagged at birth and sampled by nasal swab at 3, 27, 75, 120, 180 and 270 days of life. One sow out of 30 resulted colonized. The rate of colonized piglets/pigs was 1,7%, 0%, 100%, 100%, 18,3%, and 23,7% at the above mentioned different sampling times. At the same time environmental contamination was evaluated by dry sterile swabs. The highest rates of positive environmental samples were detected in weaning and fattening units.

INTRODUZIONE. *Staphylococcus aureus* meticillino resistente (MRSA) è emerso come importante problema di sanità pubblica ed è stato dimostrato come il suino sia implicato nella trasmissione del batterio all'uomo. Diversi studi hanno evidenziato la diffusione a livello mondiale di MRSA nell'allevamento suino, ma poche sono le informazioni riguardanti l'andamento della colonizzazione da MRSA in relazione alle diverse classi di età degli animali (1;2).

Scopo del presente studio è stato quello di valutare l'andamento della colonizzazione di MRSA attraverso la raccolta di tamponi nasali effettuati su suinetti monitorati dalla nascita fino alla macellazione. Contemporaneamente è stata valutata la contaminazione degli ambienti di stabulazione degli animali. L'approfondimento della dinamica della colonizzazione da parte di MRSA, infatti, è un passaggio fondamentale per comprendere la trasmissione di questi batteri e per lo sviluppo di pratiche per il loro controllo.

MATERIALI E METODI. Lo studio si è svolto in un allevamento a ciclo chiuso della provincia di Modena. precedentemente identificato come colonizzato da MRSA. L'allevamento è suddiviso in due siti. Nel sito 1 sono presenti 1550 scrofe e i suinetti in svezzamento, nel sito due sono presenti i locali di messa a terra ed ingrasso. 30 scrofe di diverso numero di parti sono state sottoposte a tampone nasale al 80° giorno di gestazione. Dagli stessi animali è stato prelevato un campione tramite strofinamento della mammella con garze sterili (Sodibox®) 3 giorni dopo il parto. 10 suinetti di 6 scrofe (5 scrofe scelte a caso e l'unica risultata colonizzata) sono stati marcati individualmente con marca auricolare e sottoposti a tampone nasale secondo la seguente tempistica: tre giorni dalla nascita; un giorno prima dello svezzamento (giorno 27); fine svezzamento (giorno 75); inizio ingrasso (giorno 120); metà ingrasso (giorno 180); macellazione dopo iugulazione. (giorno 270). Inoltre, attraverso l'uso dei Sodibox® sono stati raccolti 30 campioni ambientali dalla sala gestazione in presenza delle scrofe e 10 campioni rispettivamente dalla sala parto, locali svezzamento, messa a terra e ingrasso. I campionamenti ambientali sono avvenuti negli ambienti pieni (presenza di

animali) e vuoti (locali puliti e sanificati in assenza di animali) seguendo il percorso degli animali marcati durante il loro ciclo di crescita.

Le procedure di laboratorio hanno previsto un prearricchimento dei campioni in Mueller-Hinton contenente 7,5% di NaCl; dopo 24 h di incubazione a 37° i campioni prearricchiti sono stati inoculati nei brodi selettivi TSB e PRMB addizionati con aztreonam e oxacillina, che dopo incubazione a 37°C per 16 ore, sono stati seminati in parallelo sui terreni selettivi Brilliance MRSA (Oxoid,UK) e Oxacillin Resistance Screen Agar (Oxoid,UK). Dopo 48 ore di incubazione, le colonie sospette sono state identificate come *S. aureus* tramite tecniche standard: morfologia della colonia, colorazione di Gram, test della catalasi e della coagulasi.

L'identificazione della specie tramite l'amplificazione del gene *nuc* e del gene codificante per la resistenza ai beta-lattamici *mecA* è stata inoltre effettuata tramite PCR secondo metodiche precedentemente descritte (3;4).

RISULTATI. Dall'analisi dei tamponi nasali effettuati sulle scrofe, solo un animale è risultato positivo per MRSA. La raccolta di Sodibox® a livello della cute della mammella ha dato esito negativo per tutte le scrofe.

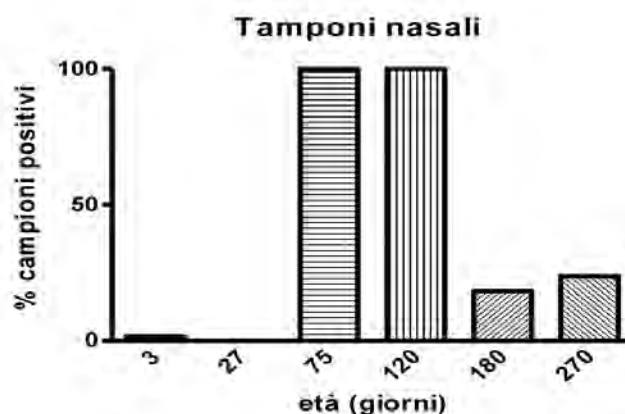
La ricerca di MRSA nei tamponi nasali effettuati nei suinetti di tre giorni ha evidenziato la positività di 1 solo soggetto (1,7%). Tale soggetto non apparteneva alla nidiata della scrofa risultata positiva per MRSA dal tampone nasale.

I tamponi del 27° giorno di età sono risultati tutti negativi, mentre, nelle fasi successive (alla fine del periodo di svezzamento e all'inizio dell'ingrasso) tutti i tamponi nasali dei suini si sono dimostrati positivi per MRSA (75° e 120° giorno).

Dopo 6 mesi dalla nascita (metà ingrasso, 180° giorno) i campioni positivi sono risultati 11 (18,3%).

Al momento della macellazione su 59 campioni, 14 sono risultati positivi per MRSA (23,7%) (Figura 1).

Figura 1: Percentuali di positività dei tamponi nasali nelle diverse fasi di accrescimento



Per quanto riguarda la ricerca di MRSA nell'ambiente non sono stati riscontrati campioni positivi né a livello della sala gestazione, né nelle sale parto piene, né in quelle pulite e sanificate. Nelle gabbie di svezzamento piene sono risultati positivi 5 Sodibox® su 10 (50%) ed in quelle vuote 4 su 10 (40%). Nella fase di messa a terra sono stati individuati 5 campioni positivi nei locali pieni (50%) e 2 nei locali vuoti (20%). Nell'ultima fase, quella di ingrasso, i campioni positivi sia degli ambienti pieni che di quelli vuoti sono risultati pari a 1 (10%) (Figura 2)

Figura 2: Percentuali di positività nei locali pieni e vuoti. sp: sala parto piena/vuota; sv: sala svezzamento piena/vuota; mt: locali messa a terra o pieni/vuoti; ing: locali ingrasso pieni/vuoti



DISCUSSIONE. Lo studio longitudinale condotto in allevamento apporta informazioni originali riguardo all'epidemiologia della colonizzazione da parte di MRSA nelle varie fasi di età dei suini. Ad oggi, infatti, non vi sono lavori scientifici che prendano in considerazione periodi di monitoraggio così prolungati (9 mesi) e che, soprattutto, considerino sia la colonizzazione animale che la contaminazione degli ambienti in cui gli animali sono stabulati.

Smith et al., (1) hanno campionato, attraverso tamponi nasali, 209 suini di 7 diversi gruppi di età. A nove e 12 settimane di vita la percentuale dei tamponi positivi era del 100% per poi abbassarsi successivamente: 90%, 50%, 63%, 50% e 36% a 15, 18, 21, 24 settimane e in suini adulti.

Weese et al., (2) con uno studio longitudinale che ha coinvolto sia le scrofe che i suinetti nella fase di pre-svezzamento e di post-svezzamento hanno evidenziato una prevalenza totale nella fase di pre-svezzamento pari al 34.5%. In particolare ai giorni 1, 3, 7, 14 e 21 dopo la nascita la prevalenza dei suinetti era pari a 1%, 6,2%, 8,5%, 4,4% e 20%. Nella fase post-svezzamento la prevalenza totale era pari all'85% e pari al 34%, 65%, 50% e 42% rispettivamente ai giorni 28, 42, 56 e 70. Da questa indagine risulta inoltre che i suinetti nati da madri positive per MRSA a livello nasale nei giorni prima del parto o al momento del parto, presentano una probabilità maggiore di essere colonizzati. Tuttavia anche i suinetti nati da madri negative sono risultati positivi per MRSA nel corso dello studio. Nel presente studio non è stata osservata una correlazione tra la positività delle scrofe e quella dei suinetti; l'unico suinetto positivo nel primo campionamento (3 giorni dalla nascita) infatti

è nato da una madre negativa per MRSA, mentre i suinetti nati dalla scrofa positiva sono risultati, in quel periodo di campionamento, negativi.

Nel corso dello studio è stato osservato un brusco innalzamento dei campioni positivi dei suini campionati alla fine dello svezzamento (100%). A circa 120 giorni dalla nascita (inizio ingrasso) i campioni positivi sono ancora il 100%, mentre alla fine dell'ingrasso (180° giorno) la prevalenza cala drasticamente passando al 18%, dato che viene praticamente confermato dal campionamento successivo (23%).

L'andamento della prevalenza di MRSA nelle fasi di età, pur non essendo completamente sovrapponibile ai due lavori citati, è comunque paragonabile. Anche nella nostra indagine, infatti, sembra che la fase critica per la colonizzazione sia tra la quarta e l'undicesima settimana di vita.

In questo studio si è registrato un andamento analogo fra i tassi di positività dei campioni prelevati dagli animali e negli ambienti nelle diverse fasi di allevamento. Nel reparto gestazione e nelle sale parto non è stata evidenziata contaminazione ambientale e solo una scrofa su trenta è risultata colonizzata. Un suinetto su 60 è risultato colonizzato a 30 giorni di vita e nessuno su 60 alla fine del periodo sottoscrofa. Nel periodo successivo, nei locali di svezzamento, la prevalenza ha raggiunto il 100%. Il fatto che in tali locali, al momento dell'introduzione dei suinetti sia stata rilevata una contaminazione residua post-sanificazione, potrebbe essere alla base del netto aumento della prevalenza, suggerendo un ruolo importante dell'ambiente nel determinare la colonizzazione nasale nei soggetti *naïve*. Nei locali di svezzamento e messa a terra si sono riscontrati i maggiori tassi di colonizzazione nasale e di campioni ambientali positivi. Nei reparti di ingrasso si assiste ad una diminuzione di entrambi i parametri.

Resta da appurare con ulteriori studi se questa associazione possa essere estesa alla generalità degli allevamenti.

Per quanto riguarda le informazioni scaturite dallo studio longitudinale si può ipotizzare, anche in relazione ad altri studi simili, che l'età e l'ambiente giochino un ruolo rilevante nella epidemiologia di MRSA.

L'ipotesi che si può formulare sull'andamento della colonizzazione da MRSA è che questo dipenda sia da fattori ambientali ma anche da fattori che influiscono direttamente sull'animale come lo stress e l'adattamento alle diverse fasi e condizioni di allevamento.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- (1) Smith TC., Male MJ., Harper AL., Kroeger JS., Tinkler GP., Moritz ED., Capuano AW., Herdwaltdt LA., Diekema DJ., (2009) "Methicilli-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is present in Midwestern U.S. swine and swine workers. PLoS ONE, 4, 1-6.
- (2) Weese JS., Zwambag A., Rosendal T., Reid-Smiyh R., Frienship R., (2010) "Longitudinal investigation on Methicilli-Resistant *Staphylococcus aureus* in piglets" Zoonoses and Public Health, 1-6.
- (3) Brakstad O., Aasbakk K., Maeland J.A., (1992) "Detection of *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction Amplification of the nuc Gene". J. Clinic Microbiol. 30, 1654-1660.
- (4) Strommenger B., Kettlitz C., Werner G., Witte W., (2003) "Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of Nine Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in *Staphylococcus aureus*" J. Clinic Microbiol. 41, 4089-4094

STAFILOCOCCI COAGULASI POSITIVI METICILLINO-RESISTENTI NEL CANE: SORVEGLIANZA PASSIVA, 2008-2011

Franco A., Bruni G., Carratù D., Iurescia M., Buccella C., Cerci T., Dottarelli S., Ianzano A., Sorbara L., Alba P., Lorenzetti R., Battisti A.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni di Lazio e Toscana, Direzione Operativa Diagnostica Generale, Centro di Referenza Nazionale per l'Antibioticoresistenza, Via Appia Nuova 1411, 00178 Roma

Key words: methicillin-resistant coagulase-positive *Staphylococcus*, *Staphylococcus pseudintermedius*, dogs

ABSTRACT

We report the proportion of methicillin-resistant coagulase-positive *Staphylococci* (MRCPS) on the total coagulase-positive *Staphylococci* (CPS) detected in necropsy lesions and clinical samples from dogs, including dermatitis and otitis (n=918), over the last three-year period of passive surveillance (2008-2011). *Staphylococcus pseudintermedius* was the most prevalent species, followed by *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, along with sporadic *S. aureus* isolates. After the first cases of MRCPS infection detected, which date back to 2006, we observed an abrupt rise in the proportion of MRCPS on the total isolates detected from the above samples, that reached 20% at the end of 2008. At present the proportion of all MRCPS on the total of CPS detected exceeds 30%. Concerns arise also from the multi-resistance patterns to the major classes of antibiotics used in veterinary medicine, so that infections caused by MRCPS isolates (especially methicillin-resistant *S. pseudintermedius*) nowadays represent one of the most serious therapeutic challenge in companion animal medicine.

INTRODUZIONE

Stafilococchi coagulasi positivi (CPS) sono responsabili di varie forme morbose nell'Uomo e negli animali zootecnici e da compagnia. L'agente patogeno principale associato al cane e probabilmente coevoluto con i canidi è *S. pseudintermedius* (1, 2) mentre l'infezione da *S. aureus* è più sporadica, e spesso dovuta a contatti o contaminazioni con altre specie animali e con l'Uomo (3). *S. pseudintermedius* meticillino-resistente (MRSP) è emerso e si è diffuso su scala mondiale nell'ultimo decennio (4), divenendo spesso una minaccia per la salute degli animali a causa delle concomitanti multi-resistenze che limitano fortemente la possibilità di terapia efficace di alcune infezioni localizzate, spesso ad andamento cronico, e con possibile esito di generalizzazione. *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) è una causa importante di infezioni nosocomiali e causa emergente di infezioni nella comunità, che, possono essere causati da cloni circolanti negli animali, come descritto anche in Italia (5).

Staphylococcus schleiferi subsp. *coagulans* è un altro agente tra CPS associato ai canidi, ed è stato riscontrato specialmente come causa di forme di dermatite e di otite (6). Nel corso degli ultimi anni sono stati segnalati vari isolamenti di *S. schleiferi* subsp. *coagulans* meticillino-resistente (MRSS) e con frequenza anche concomitante multiresistenza (7).

MATERIALI E METODI

Nel periodo considerato (2008-2011) sono pervenuti complessivamente 918 campioni clinici o campioni di lesioni in sede di necropsia, appartenenti ad altrettanti soggetti diversi. Gli isolati sospetti riferibili a *Staphylococcus* sono stati sottoposti a test della coagulasi e la differenziazione tra *S. aureus*, *S. intermedius* Group, *S. schleiferi* è stata ottenuta

mediante Polymerase Chain Reaction e Restriction Fragment Length Polymorphism-PCR (1). Gli isolati sono stati sottoposti a test di sensibilità ai chemioantibiotici secondo Standard Internazionali (CLSI). Lo screening fenotipico per la resistenza ai beta-lattamici è stato eseguito secondo tecnica di agar diffusion con oxacillina (disk potency 10 mcg), e cefoxitina (disk potency 30 mcg) e gli isolati resistenti o a sensibilità intermedia sono stati sottoposti a conferma mediante PCR per il gene *mecA* (3).

RISULTATI

Nel periodo considerato sono stati isolati n=270 CPS, per un tasso di isolamento complessivo pari al 29,4%. Il numero di CPS isolati per anno e la distribuzione percentuale suddivisa tra meticillino-sensibili e meticillino-resistenti, rispettivamente sul totale dei campioni pervenuti e su un subset di campioni da forme morbose cutanee ed auricolari, sono riportati in Figura 1 e Figura 2.

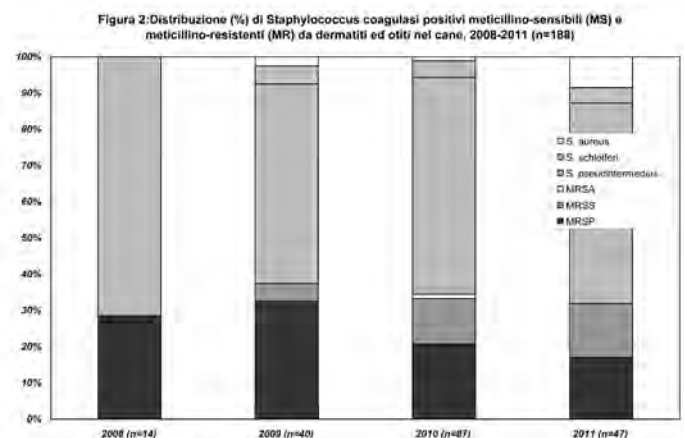
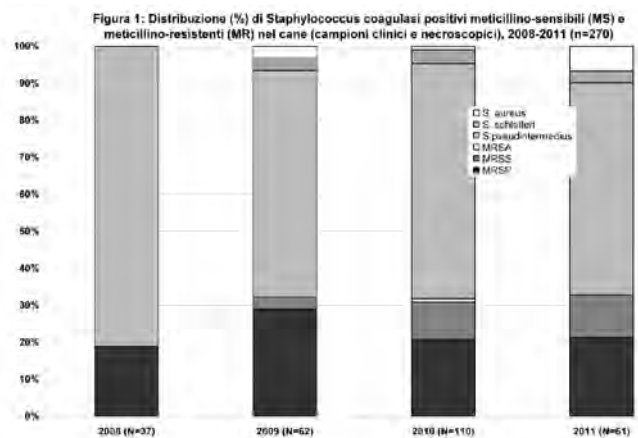
Discussione

Nella nostra esperienza, emerge che MRSP da casi clinici e da lesioni in sede di necropsia esaminati dalla sorveglianza passiva era stato inizialmente rilevato a partire dal 2006, con tasso di isolamento <5% su totale degli animali esaminati, ovvero il 16% dei CPS isolati (8). Tali MRCPS rappresentavano circa il 20% dei CPS isolati dai casi giunti per accertamenti di laboratorio già nel 2008. Nel quadriennio considerato (2008-2011), la presenza di MRSA si è confermata sporadica nel cane (Figura 1 e 2), ed è stato osservato un lieve aumento della proporzione di MRSS rispetto ad MRSP da campioni clinici, specialmente da dermatiti ed otiti (Figura 2), per quanto tale osservazione non raggiunge significatività statistica. Attualmente, la proporzione di Stafilococchi coagulasi-positivi meticillino-resistenti, eccede il 30% del totale di tutti i CPS isolati dai casi esaminati. E' preoccupante infine l'elevata multiresistenza di MRSP, ed in parte anche di MRSS, con frequenze elevate di contemporanea resistenza a classi di antibiotici fondamentali nella terapia delle infezioni da Gram-positivi nel cane, come aminoglicosidi, macrolidi, lincosamidi, fluorochinoloni, tetracicline, amphenicoli, sulfonamidi, inibitori della diidrofollato reductasi (dati non mostrati), condizione che rende sempre più spesso virtualmente impossibile per il veterinario clinico un approccio terapeutico efficace, specialmente nelle infezioni invasive.

BIBLIOGRAFIA:

1. Bannoehr J, Franco A, Iurescia M, Battisti A, Fitzgerald JR. Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. J Clin Microbiol. 2008 Dec 17
2. Bannoehr J., N. L. Ben Zakour, A. S. Waller, L.

- Guardabassi, K. L. Thoday, A. H. van den Broek, and J. R. Fitzgerald. 2007. Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insights into agr diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. *J. Bacteriol.* 189:8685–8692.
3. Perreten V, Kadlec K, Schwarz S, Grönlund Andersson U, Finn M, Greko C, Moodley A, Kania SA, Frank LA, Bemis DA, Franco A, Iurescia M, Battisti A, Duim B, Wagenaar JA, van Duijkeren E, Weese JS, Fitzgerald JR, Rossano A, Guardabassi L., 2010. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. *J Antimicrob Chemother.*, 65:1145-1154. Epub 2010 Mar 25
 4. Loeffler A, Boag AK, Sung J, Lindsay JA, Guardabassi L, Dalsgaard A, Smith H, Stevens KB, Lloyd DH. 2005 Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in the U K. *J Antimicrob Chemother.* 56 692-697
 5. Pan A., Battisti A., Zoncada A., Bernieri F., Boldini M., Franco A., Giorgi M., Iurescia M., Lorenzotti S., Martinotti M., Monaci M., Pantosti A., 2009. Community-acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 Infection, Italy. *Emerging Infectious Diseases*, 15: 845–847
 6. Rich M, Roberts L, Jones M, Young V., 2007 *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* in companion animals. *Vet Rec.* 2007 Jul 21;161(3):107.
 7. Kawakami T, Shibata S, Murayama N, Nagata M, Nishifuji K, Iwasaki T, Fukata T., 2010. Antimicrobial susceptibility and methicillin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolated from dogs with pyoderma in Japan. *J Vet Med Sci.* 2010 Dec;72(12):1615-9.
 8. Iurescia M., Franco A., Di Egidio A., Cordaro G., Di Matteo P., Sorbara L., Buccella C., Cerci T., Onorati R., Lorenzetti S., Feltrin F. Ianzano A., Battisti A., 2007. Stafilococchi coagulasi positivi meticillino-resistenti in animali da compagnia: la sorveglianza passiva nell'area romana, 2005-2007 Atti del IX Congresso Nazionale S.I:Di.L.V., pp. 78-79



Legenda:

MRSA: Methicillin-resistant *S. aureus*

MRSP: Methicillin-resistant *S. pseudintermedius*

MRSS: Methicillin-resistant *S. schleiferi*

PROFILASSI E RISANAMENTO DI UN GREGGE OVINO INTERESSATO DA UN FOCOLAIO DI MASTITE DA *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Marogna G., Fiori A., Barbato A., Schianchi G., Leori G. S.

Dipartimento Produzioni dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreffi"

Key words: streptococchi, noduli mammari, vaccino stabulogeno.

ABSTRACT

In this work, we describe the successful eradication plan performed on an ovine flock with severe mastitis caused by *Enterococcus faecalis*. During the eradication plan, lasted about three years, we adopted several measures of management and prophylaxis including antimicrobial therapy and vaccination.

INTRODUZIONE

Le mastiti batteriche degli ovini da latte sono provocate principalmente da due gruppi di Gram + : gli stafilococchi e gli streptococchi. Fra gli streptococchi sono principalmente chiamati in causa due generi: *Streptococcus* e *Enterococcus*. Negli ultimi anni, perlomeno in Sardegna, le infezioni causate da streptococchi sono in aumento. Il fenomeno sembrerebbe legato alle mutate condizioni di allevamento che oggi prevedono tempi di stabulazione sempre più lunghi, fenomeno che sembra avvantaggiare germi opportunisti ed ambientali come gli streptococchi. In una recente indagine condotta fra allevamenti con gravi e ricorrenti quadri di mastiti batteriche in Sardegna, fra gli streptococchi, le infezioni da *Enterococcus faecalis* sono seconde solo a quelle provocate dallo *Streptococcus uberis* (Marogna et al., 2010). Al contrario, in alcune ricerche che hanno monitorato allevamenti "normali", non italiani, *Enterococcus faecalis* risulterebbe un batterio raramente isolato dal latte di pecora, mostrando una prevalenza del 2,6-3,6% (McDougall et al., 2002). In questo lavoro descriviamo il risanamento di un gregge sede di un importante focolaio di mastite da *Enterococcus faecalis*. Questo focolaio, sia per la gravità delle lesioni cliniche riscontrate sia per il numero degli animali colpiti, il 24 % delle pecore adulte in lattazione (Tempo 0), rappresenta un caso limite che abbiamo ritenuto opportuno segnalare e descrivere. Non abbiamo trovato riscontri analoghi in letteratura. Il lavoro riporta i risultati di un piano di risanamento ottenuto attuando uno specifico protocollo di profilassi sanitaria e immunizzante. Questa ultima, in particolare, ha previsto la produzione e la stima dell'efficacia "sul campo" di un vaccino stabulogeno specifico per *Enterococcus faecalis*.

MATERIALI E METODI

La consistenza iniziale dell'allevamento, al momento del nostro primo ingresso (Tempo 0), era di circa 1.300 pecore adulte. Di queste, 318 erano la rimonta, 860 le pecore adulte in lattazione, 53 le adulte in asciutta e 47 le adulte non partorite. Le pecore erano tutte di razza Sarda e venivano munte meccanicamente con impianto a lattodotto da 48 poste. Il management prevedeva il pascolamento di prati naturali ed erbai per gran parte della giornata, il pernottamento notturno in stalla (con lettiera) e l'utilizzo di mangimi commerciali concentrati, somministrati durante le mungiture (non più di 400 gr/die). Al momento del nostro primo monitoraggio (Tempo 0) le pecore si trovavano nell'ultimo periodo della lattazione, in prossimità dell'asciutta. Abbiamo visitato e prelevato il latte a tutte le pecore in lattazione presenti in allevamento. Questi esami ci hanno consentito di avere il quadro della situazione clinica e degli agenti infettanti le mammelle. Da questi risultati siamo partiti per programmare il piano di risanamento del gregge. Gli animali sono stati monitorati per tre

anni consecutivi (da Tempo 0 a Tempo III) con uno screening generale previsto sempre a ridosso dell'asciutta di ogni stagione produttiva (luglio-agosto). L'esame clinico della mammella si eseguiva a mammella munta, differenziato per emimammella, e comprendeva un esame ispettivo, la valutazione della consistenza della emimammella e dell'aspetto macroscopico del latte munto, l'esame dei linfonodi sopramammari e l'eventuale presenza di "lùpia", una mastopatia fibrocistica di eziologia non nota, di riscontro relativamente frequente nei nostri allevamenti da latte. L'esame ispettivo valutava la presenza di: pustole, croste, escrescenze cornee, ulcere, noduli, ascessi, *rubor*, *calor* e *dolor* (questi ultimi 3 rispettivamente al termotatto e alla palpazione). La consistenza mammaria alla palpazione veniva differenziata in: normale, edematosa, sclerotica e atrofica. L'aspetto macroscopico del latte veniva differenziato in: normale, sieroso, emorragico, con pus, con frustoli, secreto assente. La pratica del prelievo di latte prevedeva una preventiva pulizia e disinfezione dei capezzoli e quindi l'eliminazione dei primi schizzi di latte e una nuova disinfezione. Il latte, munto a mano, sempre dallo stesso operatore, veniva raccolto all'interno di provette sterili da 50 ml a chiusura ermetica. Il prelievo non veniva differenziato per emimammella, ma si costituiva una miscela del latte di ogni singola mammella. I campioni di latte venivano immediatamente posti a 5 °C, quindi trasportati al laboratorio dove si procedeva all'immediata semina culturale. Aliquote di 10 µl di latte di ciascun campione venivano seminate su piastre con diversi terreni di coltura per l'isolamento e l'identificazione batterica, ed incubate a 37°C per 24-48 ore. I batteri isolati sono stati sottoposti a colorazione di Gram, e tutti i Gram positivi sono stati identificati a livello di specie, sia mediante tecniche biochimiche (test della catalasi e della coagulasi, gallerie API-BioMerieux) che mediante metodi molecolari. In questo lavoro infatti, i metodi biochimici sono stati affiancati da tecniche di identificazione mediante PCR per diverse specie di stafilococchi e streptococchi, utilizzando primers specie-specifici. Il vaccino stabulogeno è stato allestito a partire da una colonia di *Enterococcus faecalis* clonata da un'altra, identificata con metodo biochimico e conferma molecolare. L'allestimento del vaccino prevedeva una prima amplificazione che consisteva nello stemperare in una provetta di Nutrient Broth (Oxoid) una singola colonia di streptococco tipizzato ed quindi incubazione a 37°C per 24 ore; quindi si procedeva con un'ulteriore amplificazione eseguendo una nuova semina su un numero di unità di terreno di crescita proporzionale alla quantità di antigene necessaria alla preparazione delle dosi di vaccino da inoculare agli animali; questa seconda amplificazione avveniva seminando la sospensione madre di Trypticase soy broth (Oxoid), ed incubando per 24 h a 37°C. Il controllo della purezza della sospensione veniva effettuato eseguendo direttamente uno striscio su vetrino con colorazione di Gram e quindi una nuova semina in piastra di agar-sangue con incubazione a 37 °C per 36-48 ore, con conseguente nuovo striscio e colorazione di Gram. La brodo-cultura veniva quindi centrifugata a 6.000 g/min in centrifuga Sorvall refrigerata e il pellet dei batteri raccolto in soluzione fisiologica fino ad ottenere la una concentrazione di streptococchi (109 UFC/ml). A questo volume di sospensione, si

aggiungeva come adiuvante una quantità di idrossido di alluminio sufficiente ad ottenere una concentrazione finale al 10%, e quindi, si lasciava la soluzione in agitazione per circa 2 ore. L'inattivazione veniva attuata aggiungendo alla sospensione della formaldeide al 40% (Carlo Erba) per raggiungere una concentrazione finale del 0.05%, così come previsto dalle linee guida per la preparazione dei vaccini stabulogeni che uniformano le metodiche di produzione fra i diversi Istituti Zooprofilattici. L'intero volume della sospensione così ottenuta veniva incubato a 37°C, in agitazione, per 24 ore e quindi in flaconato. I controlli sul prodotto finito sono stati distinti in fisico-chimici (aspetto e pH), microbiologici (controlli di sterilità) e biologici (controlli di tossicità su topino). Per quanto concerne i controlli di sterilità, le prove hanno comportato la semina contemporanea di una aliquota della sospensione su diversi terreni di crescita:

- 1) agar sangue per verificare una eventuale crescita di batteri aerobi;
 - 2) Sabouraud (Oxoid, U.K.) per verificare la crescita delle muffe;
 - 3) Thioglicolate Broth (Oxoid) per verificare la crescita degli anaerobi;
 - 4) Hayflick agar per verificare l'eventuale crescita di micoplasmi;
- Il controllo della tossicità ha previsto l'inoculazione sottocutanea su topino di 1 ml di vaccino e quindi l'osservazione per 24 ore. Per quanto concerne al protocollo di risanamento in accordo con allevatori e veterinario aziendale si è proceduto come segue:

- Vaccinazioni – il primo anno si è eseguita una prima vaccinazione a fine agosto con un richiamo a 30 giorni di distanza. Queste prime due inoculazioni hanno interessato tutto l'effettivo del gregge, compresa la rimonta. A partire da questa data i richiami annuali sono stati differenziati come segue: tutti i capi adulti venivano richiamati fra fine dicembre e inizio di gennaio e quindi una seconda volta a giugno; le future primipare invece, una prima volta attorno alla fine di febbraio e quindi anche loro, una seconda volta a giugno. Questo ogni anno per tre anni consecutivi.

- Profilassi sanitaria – questa ha comportato diverse azioni. Avevamo constatato che la falda dalla quale si otteneva l'acqua utilizzata per tutti gli scopi aziendali era relativamente superficiale (7 metri) e che durante il periodo delle piogge, facilmente veniva "inquinata" dal percolato. Si è quindi prevista la raccolta dell'acqua pompata dal pozzo in un serbatoio e quindi la sua clorazione a monte della distribuzione. La lettiera delle zone di pernottamento è stata composta con paglia di grano e regolarmente sostituita. Particolare cura è stata riservata alla mungitura, sono stati previsti controlli regolari sulle tarature della mungitrice eseguiti da tecnici specializzati e si è prevista l'introduzione della pratica del diping. Questa consisteva nel nebulizzare con uno spruzzino i capezzoli alla fine di ogni mungitura utilizzando una soluzione disinfettante a base di Sali d'ammonio quaternario.

- Terapia – l'utilizzo della terapia è stato ridotto al minimo. Si è deciso di praticarla solo in casi eccezionali. Il concetto generale è stato quello di privilegiare la riforma al tentativo di risanamento con antibiotici. In ogni caso ci si è orientati (dopo antibiogramma) verso l'utilizzo del principio attivo tilosina, con terapie di 5 giorni e isolamento degli animali trattati.

- Riforma - questa è stata una delle voci fondamentali nel risanamento. Tutti i capi con lesioni nodulari sono stati sistematicamente scartati dall'allevamento il più rapidamente possibile. Ogni anno, al termine di ogni screening batteriologico del latte, tutti i capi positivi per *Enterococcus faecalis* venivano scartati.

RISULTATI

Diagnosi da latte – (Tempo 0) animali esaminati 860; capi con *Enterococcus faecalis* 206 (24 %), altre specie batteriche isolate non sono state ritenute statisticamente significative. (Tempo

I) animali esaminati 741; capi con *Enterococcus faecalis* 44 (6 %). (Tempo II) animali esaminati 937, capi con *Enterococcus faecalis* 0 (zero). (Tempo III) animali esaminati 933, capi con *Enterococcus faecalis* 0 (zero).

Esami clinici – L'infezione da *Enterococcus faecalis* è stata associata in modo statisticamente significativo alla presenza di noduli mammari. Le dimensioni di questi noduli sono variate da quelle di un pisello a quelle di un mandarino. I grossi noduli erano spesso singoli e in generale il loro riscontro era raro. Più comune era invece il riscontro di numerosi piccoli noduli interessanti entrambe le emimammelle. Il pacchetto dei linfonodi sopramammari risultava quasi sempre molto reattivo. In numerosi capi abbiamo riscontrato un secreto mammario sieroso (molto simile a quello che si rinviene in corso di *Agalassia contagiosa*). Comune è stato anche il riscontro di sclerosi ed atrofie monolaterali che però non sono state correlate in modo esclusivo all'infezione da *Enterococcus faecalis*, ma erano spesso associate ad altre forme di mastite provocate da stafilococchi coagulasi negativi, presenti comunque in numero poco significativo. Nel corso degli ultimi due screening clinici non abbiamo individuato casi di noduli mammari in allevamento.

DISCUSSIONE

Il risultato finale di tutte le azioni di profilassi, terapia e mangement è stato il risanamento del gregge. In condizioni di campo molte sono le variabili che possono intervenire a favorire o complicare l'opera di risanamento. In questo caso è difficile dare un peso, capire quale delle azioni intraprese ha avuto più o meno importanza nel risanamento. Quest'ultimo deve essere considerato conseguenza di tutte le azioni intraprese. Una delle difficoltà maggiori incontrate è stata quella di individuare per tempo gli animali serbatoio e fonte di infezione. Premesso che nella pratica di campo, è molto difficile ipotizzare e eseguire screening batteriologici sul latte di tutti gli animali del gregge eseguendo controlli con intervalli relativamente brevi, noi abbiamo optato per un unico screening generale, annuale, verso la fine di ogni lattazione. Questa scelta, unita agli esami clinici minuziosi delle emimammelle di ogni capo, ha il pregio di dare un'idea chiara dello stato sanitario di gran parte del gregge ma ha il difetto di non riuscire ad individuare per tempo gli animali serbatoio e fonte di infezione. Questo spiegherebbe, almeno in parte, la presenza in allevamento di animali infetti e con segni clinici ad un anno di distanza dal primo screening. Pensiamo che fra gli animali che per vari motivi non si era riusciti ad analizzare al Tempo 0 ci potessero essere capi infetti, e che questi abbiano consentito un minimo di circolazione batterica anche nella stagione successiva. Una azione fondamentale nell'opera di risanamento è stata quella della riforma. Normalmente un gregge sardo ha una riforma del 20-25 %, mentre lo scarto del primo anno, nell'allevamento da noi monitorato, è arrivato al 38 %, di gran lunga superiore a quello previsto. Ad aggravare quindi il quadro economico dell'impresa, già provata dal crollo della produzione latte e dalle altre perdite dirette ed indirette causate dalla mastite, si deve aggiungere l'impoverimento numerico del gregge, nel quale l'originaria quota di rimonta non è stata in grado di compensare gli animali eliminati. Gli allevatori hanno dovuto allevare molto di più negli anni successivi in modo da compensare gli scarti e ritornare ad un numero di animali dimensionato per le potenzialità aziendali. Scartare e allevare tanto, normalmente non è molto remunerativo, tuttavia nel contesto da noi affrontato riteniamo che sia stata una scelta obbligata che ha contribuito in modo fondamentale al risanamento. In conclusione vorremo rimarcare il fatto che sia la descrizione di un focolaio di mastite da *Ent. faecalis* che l'utilizzo di uno specifico vaccino stabulogeno, perlomeno stando alle nostre fonti, sono assolutamente inediti.

ISOLAMENTO DA GAZZA DI UN NUOVO MICRORGANISMO APPARTENENTE ALLA FAMIGLIA *CHLAMYDIACEAE*

Rizzo F.¹, Vicari N.², Ameri M.¹, Renna G.¹, Labalestra I.², Robetto S.³, Orusa R.³, Mandola M. L.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (IZS PLV), S.S. Lab Spec Diagnostica Molecolare Virologica e Ovocoltura, Torino, Italia, ²Centro di Referenza Nazionale per le Chlamidiosi animali, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZS LER), Sezione Diagnostica di Pavia, ³Ce.R.M.A.S. (Centro di Referenza Nazionale per le Malattie degli Animali Selvatici), IZS PLV, Quart, Aosta

Key words: *Chlamydiaceae*, analisi filogenetica, avifauna

SUMMARY

Since 2010 a *Chlamydiaceae* - specific real-time PCR targeting 23S rRNA gene has been performed on DNA extracted from tissues onto 224 wild birds. Positive samples were subsequently tested by specific real-time PCR, targeting *ompA* gene, for *C. psittaci*. A PCR-RFLP assay was also performed and positive samples were inoculated onto McCoy cell cultures. Isolation has been achieved only for two samples from Magpie. Sequence analyses of the *ompA* gene revealed a likely new, so far unclassified, member of the *Chlamydiaceae* family is circulating among birds in North-Western Italy.

INTRODUZIONE

La clamidiosi è una malattia causata da *Chlamydophila psittaci*, un batterio intracellulare obbligato che può essere trasmesso non solo ai volatili (da compagnia, da reddito e selvatici) ma anche ai mammiferi e all'uomo. Si tratta di un microorganismo di particolare interesse sanitario per le sue caratteristiche zoonosiche e la facilità di trasmissione dall'animale infetto all'uomo, tramite aerosol e per contatto diretto. La revisione della tassonomia di clamidia proposta da Everett nel 1999 (1) ha suddiviso la famiglia delle *Chlamydiaceae* nei due generi *Chlamydia* e *Chlamydophila*, che comprendono nove specie di notevole interesse in medicina umana e veterinaria.

C. psittaci si conferma l'agente eziologico più importante nelle clamidiosi aviari, potendo infettare ben 465 specie di uccelli (2). Recentemente sono state segnalate, e in alcuni casi isolate, alcune specie di *Chlamydiaceae* aviari non ancora classificate (3). Vengono qui riportati i dati ottenuti dalla ricerca di clamidie in uccelli selvatici, campionati negli anni 2010 e 2011 nel corso della normale routine diagnostica effettuata presso il laboratorio. Segnaliamo, inoltre, il primo isolamento da gazza (*Pica pica*) di una *Chlamydiaceae* non ancora classificata.

MATERIALI E METODI

A partire da gennaio 2010 e fino ad agosto 2011 sono state eseguite, nel laboratorio della sede centrale dell'IZS PLV, analisi biomolecolari per la ricerca di *Chlamydiaceae* su un totale di 224 soggetti campionati nelle regioni Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta e appartenenti a specie da avifauna selvatica e da volatili d'affezione (Tab.1). Tamponi cloacali o pool di organi da volatile (milza, fegato, intestino, reni, pericardio, sacchi aerei) sono stati in parte omogenati e in parte conservati a 4°C in SPG Medium, al fine di preservare la vitalità delle clamidie e favorirne il successivo isolamento, nel caso la PCR di screening avesse fornito esito di positività. Per l'estrazione del DNA, realizzata con kit commerciale QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Milano, Italia), sono stati utilizzati 30 mg di omogenato ottenuto da ciascun pool di organi. Gli estratti sono stati amplificati tramite una real-time PCR specifica per il gene 23S rRNA delle *Chlamydiaceae* (4). I campioni positivi sono poi stati sottoposti a real-time PCR

specie-specifica per il gene *ompA* di *C. psittaci* (5).

Ogni aliquota di campione risultata positiva al test di screening e mantenuta in SPG Medium è stata inviata, nelle condizioni di sicurezza previste dalla legislazione vigente, al Centro di Referenza Nazionale per le Chlamidiosi animali, per i tentativi di isolamento su linee cellulari McCoy. Sono state inoltre eseguite, presso il C.d.R., per l'identificazione di specie, sia real-time PCR specie-specifiche sia PCR-RFLP disegnate per il 16S rDNA (6) e il gene *omp2* (7); la digestione degli ampliconi è stata effettuata rispettivamente con gli enzimi di restrizione *MseI* and *AluI*.

I campioni che hanno fornito esito positivo anche all'isolamento su coltura cellulare, sono stati caratterizzati tramite sequenza del gene *ompA* (8). L'analisi filogenetica delle sequenze è stata realizzata attraverso software Mega5 (9), che consente di confrontare le sequenze ottenute con quelle di riferimento, selezionate tra quelle più rappresentative di ogni specie conosciuta appartenente ai generi *Chlamydia* e *Chlamydophila*.

Tabella 1: Specie analizzate e numero di esemplari risultati positivi alla PCR di screening per *Chlamydiaceae*

Specie analizzate		Testati	Positivi
Germano reale	<i>Anas platyrhynchos</i>	29	3
Piccione urbano	<i>Columba livia</i>	5	2
Poiana	<i>Buteo buteo</i>	26	0
Falco di palude	<i>Circus aeruginosus</i>	2	0
Falco bruno	<i>Falco berigora</i>	1	0
Falco pecchiaiolo	<i>Pernis apivorus</i>	1	0
Barbagianni	<i>Tyto alba</i>	1	0
Astore	<i>Accipiter gentilis</i>	2	0
Allocco	<i>Strix aluco</i>	2	0
Gheppio	<i>Falco tinnunculus</i>	13	0
Gufo comune	<i>Asio otus</i>	12	0
Gufo reale	<i>Bubo bubo</i>	2	0
Civetta	<i>Athene noctua</i>	7	0
Ghiandaia	<i>Garrulus glandarius</i>	2	0
Gazza	<i>Pica pica</i>	37	4
Sparviere	<i>Accipiter nisus</i>	18	0
Cornacchia grigia	<i>Corvus corone cornix</i>	32	0
Cornacchia	<i>Corvus corone</i>	1	0
Merlo	<i>Turdus merula</i>	2	0
Beccaccia	<i>Scolopax rusticola</i>	2	1
Passero	<i>Passer sp</i>	3	0
Rondone	<i>Apus apus</i>	1	0
Rondine	<i>Hirundo rustica</i>	1	0
Assiolo	<i>Otus scops</i>	2	0
Gabbiano reale	<i>Larus argentatus</i>	6	1
Piovanello	<i>Calidris canutus</i>	1	0
Porciglione	<i>Rallus aquaticus</i>	1	0
Gallo forcello	<i>Tetrao tetrix</i>	2	1
Pappagallo	specie ignota	5	0
Cocorita	<i>Melopsittacus undulatus</i>	1	0
Canarino	<i>Serinus canaria</i>	4	0
Totale		224	12

RISULTATI

Sul totale di 224 soggetti analizzati, 12 di questi sono risultati positivi alla real-time PCR di screening per *Chlamydiaceae*: 4 campioni da gazza, 1 da gabbiano reale, 1 da gallo forcello, 1 da beccaccia, 3 da germano reale e 2 da piccione urbano (Tab.1); tuttavia, in nessuno di questi è stata rilevata la presenza di *C. psittaci* tramite real time PCR specifica; gli stessi risultati sono stati confermati dal Centro di Referenza Nazionale per le Clamidosi animali. I saggi di RFLP-PCR allestiti presso il C.d.R. hanno fornito risultati contrastanti, che non hanno reso, quindi, possibile ricondurre alcuna positività ad alcuna specie conosciuta di *Chlamydia* o *Chlamydophila*. L'isolamento ha avuto esito positivo solo su 2 campioni da gazza della provincia di Alessandria (per i 3 germani reali l'isolamento è attualmente in corso). Le analisi di sequenza del gene *ompA* effettuate sui due ceppi isolati hanno rivelato che questi formano un cluster distinto dalle altre specie di clamidia classificate.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

Inaspettatamente, non è stata riscontrata la presenza di *C. psittaci* nei volatili selvatici analizzati e campionati sul territorio di competenza dell'IZS PLV. I risultati emersi da questo studio sono simili sia a quelli ottenuti da ricerche condotte in altri laboratori europei (3) sia ad osservazioni da noi presentate nel 2009 (10), nelle quali si metteva in evidenza la circolazione tra i germani dell'areale di Racconigi (CN) di microrganismi non classificati appartenenti alla famiglia delle *Chlamydiaceae*. L'analisi delle sequenze del gene *ompA* ci fa supporre che possa esistere una elevata variabilità intraspecifica o, alternativamente e con maggiore probabilità, i microrganismi isolati da gazza potrebbero essere ricondotti ad una nuova specie, diversa filogeneticamente da quella degli isolati da piccione in Italia, Germania e Francia. Ulteriori approfondimenti si rendono quindi necessari al fine caratterizzare in modo più esaustivo questi nuovi microrganismi.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1 Everett K.D., Bush R.M., Andersen A.A. 1999. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov.,

each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. Int J Syst Bacteriol 49, 415-440.

2. Kaleta E.F., Taday E.M. 2003. Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. Avian Pathol. 32, 435-461

3. Laroucau K., Vorimore F., Aaziz R., Berndt A., Schubert E., Sachse K. 2009. Isolation of a new chlamydial agent from infected domestic poultry coincided with cases of atypical pneumonia among slaughterhouse workers in France. Infect. Genet. Evol. 9, 1240-7.

4. Ehrlich R., Slickers P., Goellner S., Hotzel H., Sachse K. 2006. Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. Mol Cell Probes 20, 60-3.

5. Pantchev A., Sting R., Bauerfeind R., Tyczka J., Sachse K. 2009. New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* from tissue samples. Vet. J. 181, 145-150

6. Ossewaarde J.M., Meijer A. 1999. Molecular evidence for the existence of additional members of the order Chlamydiales, Microbiology 145, 411-7.

7. Hartley J.C., Kaye S., Stevenson S., Bennett J. and Ridgway G. 2001. PCR Detection and Molecular Identification of *Chlamydiaceae* Species. J Clin Microbiol. 39, 3072-9

8. Sayada C., Andersen A.A., Storey C., Milon A., Eb F., Hashimcvto N., Hirai K., Elion J. and E. Denamur. 1995. Usefulness of *omp1* restriction mapping for avian *Chlamydia psittaci* isolate differentiation. Res. Microbiol. 146, 155-165

9. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molec Biol Evol, [Epub ahead of print]

10. Vicari N., Mandola M.L., Barcucci E., Rizzo F., Bellotti M., Magnino S. 2009. "Detection of *Chlamydiaceae* in tissue and swabs from wild birds sampled for avian influenza surveillance in 2008-2009 in Piedmont, Italy". Atti del Convegno "First European meeting on Animal Chlamydioses and Zoonotic aspects". 14-16 giugno, 2009, Murcia, Spagna.

IDENTIFICAZIONE DI UN NUOVO ASTROVIRUS IN CONIGLI CON FORME ENTERICHE

**Martella V.¹, Moschidou P.¹, Catella C.¹, Lorusso E.¹, Larocca V.¹, Pinto P.¹, Circella E.¹,
Magistrali C.², Lavazza A.³, Buonavoglia C.¹**

¹Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Facoltà di Medicina Veterinaria di Bari, Valenzano (BA)

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Umbria e Marche, Perugia

³Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Lombardia ed Emilia Romagna, Brescia

Key words: Astrovirus, conigli, entero-colite, enteritis complex

SUMMARY

A novel astrovirus was discovered in rabbits. The virus was distantly related (19.3% to 23.7% aa identity) in the capsid precursor to other mammalian astroviruses within the *Mamastrovirus* genus. A real time RT-PCR was developed and used to screen collections of faecal samples from symptomatic and asymptomatic animals. Rabbit astrovirus was detected in 43.49% of the animals from outbreaks of enteric disease but only in 17.98% of asymptomatic animals. Also, the mean and median titres in the positive animals were 10²- and 10³-times greater, respectively, in the symptomatic animals than in the asymptomatic animals. These findings indicate that rabbit AstVs are common in rabbits. Inclusion of rabbit AstVs in the diagnostic algorithm of rabbit enteric disease and animal experiments will be useful in order to gain more information on the epidemiology and the potential pathogenic role of these novel enteric virus.

INTRODUZIONE

Gli Astrovirus (AstV) sono piccoli virus privi di envelope di forma rotondeggiante ritrovati nelle feci di diverse specie aviarie e di mammiferi. Il loro genoma è formato da un RNA di 6.4-7.3 kb monocatenario a polarità positiva con l'estremità 3' poliadenilata, e contiene tre ORF. Due ORF (ORF1a e ORF1b) codificano per proteine non strutturali mentre ORF2, posta all'estremità 3', codifica per il precursore capsidico (11). Nella maggior parte delle specie animali, incluso l'uomo, gli AstV sono associati a forme enteriche (11). Tuttavia sono descritte forme sostenute da AstV a localizzazione extra-intestinale, quali la nefrite aviaria infettiva, l'epatite delle anatre e la sindrome del tremore del visone (2,8,12).

Recentemente sono stati identificati nuovi AstV umani (MBL1, MBL2, VA1, HMO-A, -B, -C, VA2) molto diversi dai "classici" ceppi umani epidemici (i sierotipi 1-8) e più simili a AstV animali (1,6,7,9), suggerendo la possibilità di infezioni eterologhe e di un rischio zoonotico.

L'enterite del coniglio, o enteritis complex (EC) è una patologia enterica multifforme. Agenti batterici e parassitari e fattori ambientali sono considerati implicati nella genesi dell'EC, mentre il ruolo degli agenti virali non è chiaro. Diversi virus (rotavirus, coronavirus, parvovirus, adenovirus, calicivirus) sono stati identificati nelle feci di conigli con forme enteriche (3,10). Il *CreMaViLa* (Centro di riferimento nazionale per le malattie virali del coniglio) tra il 1997 e il 2005 ha identificato SRV (virus piccoli tondeggianti) in ME in 18/515 (3.49%) dei casi esaminati.

MATERIALI E METODI

Collezione A: campioni (vari tratti del piccolo e grande intestino, contenuto intestinale) di conigli con EC sono stati ottenuti da 23 focolai tra il 2005 e il 2008, da allevamenti con forme di EC di varia gravità in animali di età tra 25 e 55 gg.

Collezione B: un totale di 139 campioni (feci) sono state raccolte da conigli asintomatici in post svezzamento (30-35 gg) da 15 allevamenti.

Estrazione RNA e RT-PCR: omogenati al 10% dei campioni sono stati estratti con QIAamp® viral RNA kit (Qiagen GmbH, Germany) e testati con primer universali per AstV su ORF1b (5).

qRT-PCR: usando sequenze parziali ORF1b generate nello studio, sono stati disegnati primer e sonde specifiche TaqMan per AstV del coniglio. Un frammento del gene ORF1b di 409 bp è stato inserito nel vettore pCR4-TOPO (Invitrogen, Milano, Italia) e trascritto in vitro con Ribo-MAX™ Large Scale RNA Production System-T7 (Promega Italia, Milano, Italia). L'RNA è stato usato per generare una curva standard. La sensibilità del test è pari a 3,6x10² GE/gr di feci. Il test è risultato specifico, non cross-amplificando altri AstV umani e animali.

Caratterizzazione molecolare di AstV coniglio: un campione ad alto titolo (1,3x10¹⁰ GE/gr feci) è stato selezionato (ceppo Nausika/08/ITA) per amplificare un frammento di 3.4 kb alla estremità 3' del genoma con metodo RACE 3'. L'amplificato purificato è stato clonato con il kit TOPO® XL Cloning (Invitrogen, Milano, Italia). L'editing di sequenza e gli allineamenti sono stati generati con il software Bioedit v2.1. Il software MEGA v4.0 è stato usato per l'analisi filogenetica (NJ e UPGMA) con supporto bootstrap (Fig. 1).

RISULTATI

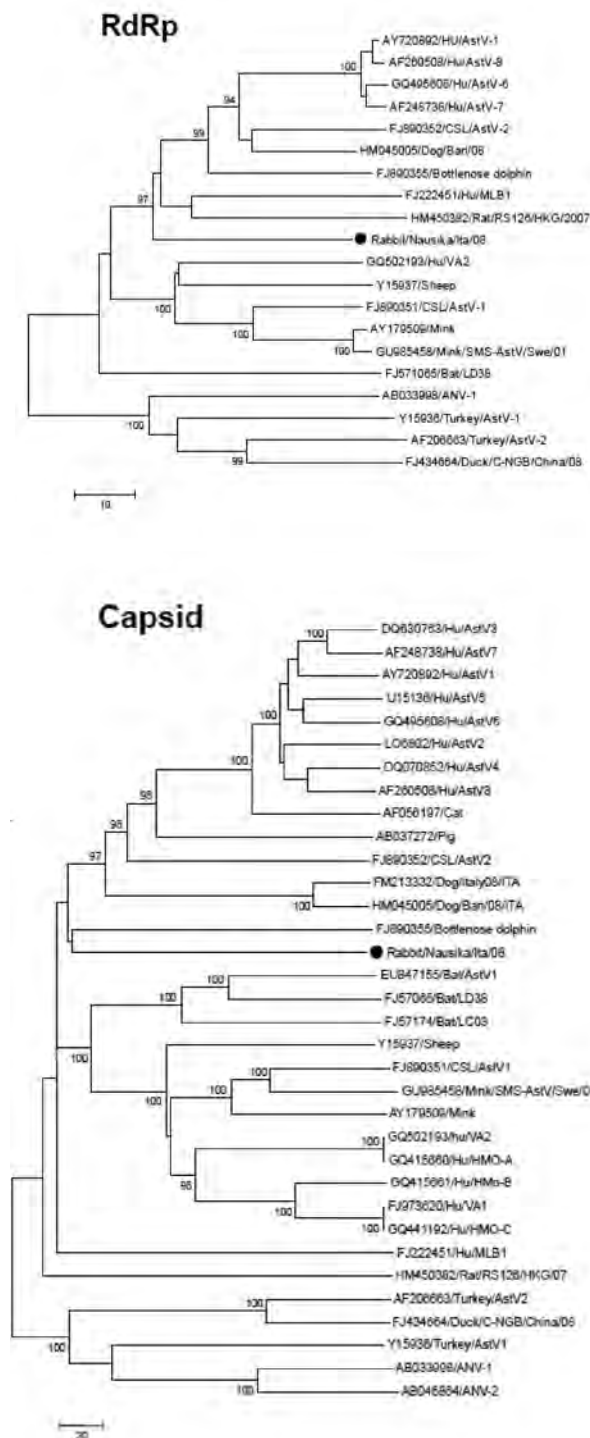
Screening in qRT-PCR: AstV è stato trovato in 10/23 campioni (43.49%) della collezione A. Inoltre è stato trovato in 25/139 campioni (17.98%) della collezione B, da 12/15 (80%) allevamenti, con prevalenza del 9 - 50%. I titoli (GE/μl RNA) nel panel A variano tra 2.0x10¹ e 3.8x10⁷ (valore medio 4.3x10⁶, valore mediano 2.1x10⁵). Nel panel B i titoli sono compresi tra 1.2x10¹ e 1.7x10⁶ (valore medio 7.6x10⁴, valore mediano 1.5x10²). La differenza tra i due gruppi è significativa sia in termini di prevalenza (P= 0.0132; P<0.05) che di titolo virale (P=0.0137; P< 0.05).

Screening in ME: in nessuno dei campioni contenente AstV del panel A è stato possibile osservare in ME particelle AstV-simili (SRV).

Caratterizzazione molecolare di AstV Nausika/08/ITA: la sequenza (3395 nt) dell'estremità 3' di ORF1b, della ORF2 e della regione non codificante (NCR) 3' fino alla coda poly-A è stata determinata. Il frammento della ORF1b (759 nt e 252 aa) risulta avere più alta identità aa (62.7%) verso AstV tipo 1 umano (numero di accesso AY720892) ed in misura minore (50.9-61.4% aa) verso altri AstV di mammiferi.

Come in altri AstV umani ed animali è presente una sovrapposizione di 8 nt tra la fine di ORF1b e l'inizio di ORF2. Il motivo altamente conservato a monte di ORF2, ritenuto un promoter per la sintesi di RNA sub-genomico (13), ATTTGGAGNGGNGGACCNAAN5-8ATGNC, è conservato. La ORF2 (2559 nt) codifica per una proteina capsidica di 852 aa. La NCR 3' è di 85 nt. Il capside mostra più alta omologia (23.7% aa) verso il virus del cane Italy05 e di delfino Bd1/. L'identità verso AstV di altri mammiferi varia tra 19.3 e 23.5% aa (Fig. 1).

Fig. 1. Albero filogenetico costruito con il metodo neighbor-joining sulle sequenze di ORF1b (RdRp) e ORF2 (capside) dei membri del genere *Mamastrovirus*. Il virus del coniglio è evidenziato con un asterisco. La barra rappresenta il numero di sostituzioni aminoacidiche per 100 residui.



DISCUSSIONE

La EC del coniglio sembra essere una patologia multifattoriale e multiforme, sebbene in alcuni casi possa assumere dei quadri peculiari riconducibili a infezioni da clostridi, E- coli e coccidi (3,10).

Usando dei primer universali e poi un sistema TaqMan molto specifico, AstV sono stati identificati nel coniglio. AstV sono stati identificati con diversa prevalenza e diverso titolo virale in due gruppi

di animali, risultando più frequenti ed eliminati a maggiore titolo nei conigli con forme enteriche (panel A). Tuttavia AstV sono stati rilevati anche in animali senza sintomatologia enterica (panel B).

In ME nessuno dei campioni positivi per AstV, neanche quelli ad alto titolo, è risultato positivo. Ciò potrebbe essere spiegato con la mancanza di reagenti sierologici per immuno-precipitare le particelle virali o con la degradazione e/o alterazione nell'ambiente intestinale delle stesse.

In conclusione, l'analisi del genoma dimostra come l'AstV del coniglio sia diverso da altri AstV animali nel genere *Mamastrovirus*. L'inclusione dell'AstV negli algoritmi diagnostici delle EC del coniglio ed esperimenti animali saranno utili per capire se AstV riveste un ruolo entero-patogeno ed in che misura.

BIBLIOGRAFIA

- Bányai K, Meleg E, Moschidou P, Martella V. Detection of newly described astrovirus MLB1 in stool samples from children. *Emerg Infect Dis.* 2010;16:169.
- Blomström AL, Widén F, Hammer AS, Belák S, Berg M. Detection of a novel astrovirus in brain tissue of mink suffering from shaking mink syndrome by use of viral metagenomics. *J Clin Microbiol.* 2010;48:4392-6.
- Ceroli M, Lavazza A. "Viral Enteritis of rabbits" CHAPTER 3.6 in Maertens L. and P. Codert (eds) "Recent advances in rabbit sciences" COST-ILVO (ISBN.92-898-6636.EPS). 2006;pp. 181-6.
- Chu DK, Chin AW, Smith GJ, Chan KH, Guan Y, Peiris JS, et al. Detection of novel astroviruses in urban brown rats and previously known astroviruses in humans. *J Gen Virol.* 2010;91:2457-62.
- Chu DK, Poon LL, Guan Y, Peiris JS. Novel astroviruses in insectivorous bats. *J Virol.* 2008;82:9107-14.
- Finkbeiner SR, Holtz LR, Jiang Y, Rajendran P, Franz CJ, Zhao G, et al. Human stool contains a previously unrecognized diversity of novel astroviruses. *Virol J.* 2009;6:161.
- Finkbeiner SR, Kirkwood CD, Wang D. Complete genome sequence of a highly divergent astrovirus isolated from a child with acute diarrhea. *Virol J.* 2008;14;5:117.
- Imada T, Yamaguchi S, Mase M, Tsukamoto K, Kubo M, Morooka A. Avian nephritis virus (ANV) as a new member of the family Astroviridae and construction of infectious ANV cDNA. *J Virol.* 2000;74:8487-93.
- Kapoor A, Li L, Victoria J, Oderinde B, Mason C, Pandey P, et al. Multiple novel astrovirus species in human stool. *J Gen Virol.* 2009;90:2965-72.
- Lavazza A, Capucci L. Viral infection of rabbits. In: *Proceedings of the 9th World Rabbit Congress*; Verona, Italy; 2008 June 10-13; p. 879-94.
- Méndez E, Arias CF. Astroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Straus SE, Martin MA, et al., editors. *Fields virology*. 5th ed. Vol.1. Philadelphia: Lippincott-Williams and Wilkins; 2007. p. 981-1000.
- Todd D, Smyth VJ, Ball NW, Donnelly BM, Wylie M, Knowles NJ, et al. Identification of chicken enterovirus-like viruses, duck hepatitis virus type 2 and duck hepatitis virus type 3 as astroviruses. *Avian Pathol.* 2009;38:21-30.
- Walter JE, Briggs J, Guerrero ML, Matson DO, Pickering LK, Ruiz-Palacios G, et al. Molecular characterization of a novel recombinant strain of human astrovirus associated with gastroenteritis in children. *Arch Virol.* 2001;146:2357-67.

RINGRAZIAMENTI: Il presente studio è stato realizzato grazie ai finanziamenti della Ricerca di Ateneo 2008, progetto "Patogeni emergenti dei ruminanti".

FEBBRE CATARRALE MALIGNA IN BANTENG (*BOS JAVANICUS*) DI UN GIARDINO ZOOLOGICO ITALIANO

¹Autorino G. L., ¹Eleni C., ¹Frontoso R., ¹Cocumelli C., ¹Rosone F., ²Di Cerbo P., ¹Altigeri A., ³Marianelli M.,
¹Lorenzetti R., ¹Manna G., ²Friedrich K., ¹Scicluna M. T.

⁽¹⁾Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma

⁽²⁾Fondazione Bioparco - Roma, ⁽³⁾Istituto Superiore di Sanità, Roma

Key Words: Banteng, malignant catarrhal fever, ovine herpesvirus 2.

SUMMARY

Malignant catarrhal fever (MCF) is a fatal, systemic disease of several species of Artiodactyla. MCF was suspected in banteng of a zoo in Rome, Italy, on the basis of the neurological clinical signs, the post-mortem gross-lesions and the histopathological picture. The use of a specific one step PCR and the subsequent nucleotide sequence analysis of the amplicon, confirmed that the virus involved one of the known epidemiological forms, i.e. the sheep associated (SA) ovine herpesvirus-2 (OvHV-2). Preliminary epidemiological investigations indicated that sheep kept in the neighbouring pens were the probable viral source of infection. This episode confirms the importance of the application of biosecurity measures in zoos which house MCF susceptible species, especially if endangered of extinction.

INTRODUZIONE

La febbre catarrale maligna (FCM) è un'infezione virale a carattere sistemico, che colpisce diverse specie di artiodattili, tra cui ruminanti domestici e selvatici, presentandosi, di norma, in forma grave ad andamento letale. Della FCM, si conoscono due forme epidemiologiche principali, entrambe sostenute da virus del genere rhadinovirus, appartenente alla sottofamiglia Gammaherpesvirinae. La prima forma è sostenuta da alcelaphine herpesvirus (AIHV-1) ed è diffusa principalmente in specie di ruminanti selvatici del continente africano, nei quali decorre in maniera asintomatica. La seconda, così detta SA-FCM, sostenuta da OvHV-2, è trasmessa dagli ovini ed è diffusa in tutti i continenti in cui sono allevati (6). Anche in questo caso, la malattia si manifesta in forma clinica e letale solo per altri ruminanti, in particolare bufali, bisonti e cervidi. Inoltre, in tali specie, considerate ospiti accidentali, la FCM assume un andamento sporadico (6). Nel continente asiatico, i banteng (*Bos javanicus*) risultano una delle specie più sensibili alla malattia, con tassi di incidenza di infezione particolarmente elevati (6). Per di più, la FCM è stata descritta in parchi zoologici dove può assumere andamenti epizootici, interessando differenti specie animali (6). Ad oggi, l'unica segnalazione in Italia è in un bisonte di uno zoo della Puglia (1). Come noto per altri virus appartenenti alla famiglia Herpesviridae, anche per i Gammaherpesvirinae è accertato il fenomeno della latenza, ma sebbene il genoma del OvHV-2 possa essere rilevato nei leucociti di sangue ovino, i siti cellulari di latenza non sono ancora conosciuti (6).

Nel presente lavoro, si descrive un focolaio di FCM che ha interessato due esemplari di un gruppo di 5 Banteng mantenuti presso il Bioparco di Roma. La struttura ha anche obiettivi scientifici e didattico-culturali e persegue la missione di educazione, conservazione e ricerca, ospitando, su una superficie di circa 17 ettari, numerose specie di ruminanti, fra le quali, molte inserite in programmi per la conservazione di specie a rischio di estinzione. In particolare, i Banteng rientrano

nell'“European Endangered Species Program” (EEP).

MATERIALI E METODI

Storia del focolaio e Sintomatologia clinica - Nel luglio 2011, due banteng, un maschio ed una femmina di circa 15 anni di età, introdotti da 14 anni nel Bioparco di Roma, sono venuti a morte a distanza di 4 giorni. I soggetti, stabulati in recinti adiacenti, hanno manifestato una sintomatologia acuta della durata di 12-18 ore. Il maschio presentava nistagmo, depressione del sensorio, difficoltà deambulatoria e manteneva la testa inclinata da un lato; la femmina, apatia, anoressia e scolo nasale catarrale e si presentava in decubito sternale. Entrambi gli animali colpiti erano mantenuti in un'area visibile al pubblico e confinante con altri due recinti: il primo alloggiava un gruppo di bisonti europei, il secondo, una vacca di razza frisona. In prossimità di detta area, sono inoltre ospitati gli animali della fattoria didattica, tra i quali un gruppo di 10 pecore “nane olandesi”, un gruppo di 11 capre tibetane, entrambi introdotti nel gennaio 2009, e un gruppo di 11 capre di razza appenninica, oltre ad altri animali da cortile. A circa 50 metri dal recinto dei banteng è anche presente un gruppo di 9 pecore sopravissane introdotte assieme alle capre appenniniche, nel luglio 2007. Inoltre, nel gruppo di capre appenniniche e pecore sopravissane erano stati immessi nuovi maschi, nel novembre 2010. Gli ultimi parti nel gruppo di pecore sopravissane e “nane olandesi” risalivano al febbraio-marzo 2011. Infine, a maggio e a giugno, i due gruppi di pecore erano stati sottoposti a tosatura.

Nel corso dell'autopsia dei banteng sono stati prelevati campioni per le successive indagini istologiche, batteriologiche e virologiche. Per l'esame istologico, i campioni sono stati fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina, sezionati a 5µm e colorati con ematossilina-eosina.

Sulla base della compatibilità del quadro clinico e delle lesioni anatomopatologiche per FCM, si è direttamente proceduto alla ricerca del genoma virale mediante PCR, controllando l'encefalo come organo bersaglio. È stato impiegato un set di primers, specifici per OvHV-2 (5) che riconoscono una regione target del ORF 75, codificante per la proteina del tegumento. I primers utilizzati, 53-OvHV2 (5'-AATCCAGATGGCTCTCGGT-TAG-3') e 353 (5'-AGGCTAGGGTCAAACAGCAAAG-3') amplificano un frammento di 301 bp tra la posizione 121213 e la 121513 del genoma dell'OvHV-2 (Refseq Genbank NC_007646.1).

L'estrazione del DNA è stata effettuata utilizzando il QIAamp DNA Mini kit, seguendo le indicazioni del produttore. L'amplificazione è stata eseguita, impiegando la Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). Dieci ml di ciascun prodotto di reazione sono stati caricati su gel di agarosio al 1,5% e le bande sono state analizzate mediante transilluminatore a UV (Fig. 1). Le sequenze ottenute dagli amplificati sono state inserite in GenBank e confrontate in Nucleotide BLAST

(blastn), per verificarne l'identità con le sequenze di OvHV-2 depositate. Per l'allineamento e le valutazioni relative all'omologia delle sequenze, sono stati utilizzati i software del pacchetto DNASTAR Lasergene 8.

Contestualmente, sono stati condotti altre indagini bio-molecolari volte ad escludere la contemporanea presenza di altri virus, fra cui, il virus della Diarrea Virale Bovina/Malattia delle Mucose (BVDV/MD) (3) e di altri Alpa herpesvirus (BoHV-1, BoHV-5, BuHV-1) (4).

Successivamente, per verificare l'origine dell'infezione, sono stati prelevati campioni di sangue con EDTA e tamponi oculo-congiuntivali a tutti i gruppi di pecore e capre sopra citati. Dai campioni di sangue con EDTA è stato ottenuto il "buffy coat" sui quali è stata effettuata la PCR.

Risultati

Lesioni anatomo-patologiche – In entrambi i banteng, si evidenziava una imponente iperemia diffusa delle meningi cerebrali, con spandimenti emorragici localizzati in particolare in corrispondenza del tronco encefalico. I polmoni erano marcatamente iperemici e presentavano edema del parenchima, con aree emorragiche. Erano presenti anche petecchie pleuropericardiche. In cavità addominale, le lesioni più rilevanti erano a carico del tratto gastroenterico, con ulcerazioni della mucosa abomasale e del primo tratto del duodeno, associate a moderata enterite catarrale diffusa; si osservava inoltre degenerazione epatica e linfadenomegalia meseraica.

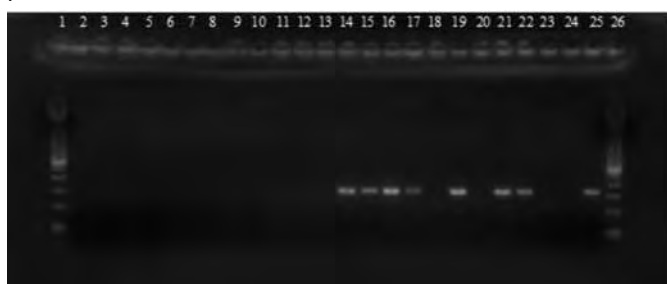
Quadro istologico – Microscopicamente era apprezzabile un quadro generalizzato di vasculite, con infiltrazione linfocitaria perivasale diffusa, da moderata a grave, associata ad emorragie e spandimenti emorragici particolarmente gravi nell'encefalo e nel polmone. Si osservavano, inoltre, infiltrati linfocitari nei reni, nel fegato, nel miocardio e nell'apparato digerente, associati ad erosione dell'epitelio della mucosa abomasale e duodenale. Il quadro isto-lesivo era suggestivo di una forma virale, in particolare compatibile con FCM.

Esiti virologici – La PCR sull'encefalo è risultata positiva per entrambi i soggetti. Il sequenziamento ha mostrato una identità del 98% con il gene della proteina del tegumento ORF75 del ceppo 1256 OvHV-2 (a.n. EU851177.1).

Le successive indagini virologiche hanno escluso la presenza del BVDV/MD, BoHV-1, BoHV-5 e BuHV-1.

Le indagini bio-molecolari, eseguite a partire dal sangue e dai tamponi prelevati ai piccoli ruminanti, hanno dato esito positivo per OvHV-2 solo negli ovini. In particolare, sono risultati positivi alla PCR, il sangue di 6 di 10 pecore sopravvissane, di cui una risultava positiva anche al tampone oculare, mentre per il gruppo di pecore "nane olandesi", risultava positivo solo il sangue di un soggetto.

Figura 1 – Risultati dell'analisi tramite PCR. Nella colonna: 1 e 26 - 100 bp DNA ladder; 14: ctr Pos; 15, 16 encefalo dei banteng; 17, 19, 21, 22, 25: Buffy coat di alcuni ovini processati.



Esame batteriologico

L'esame colturale eseguito su campioni di encefalo, liquido cefalorachidiano, polmone e fegato è risultato negativo per entrambi i soggetti. Nel maschio, il test ELISA da fluido intestinale nei confronti di antigeni di parete di *C. perfringens* e di alfa, beta, e gamma tossine ha rilevato positività per *C. perfringens* e della sola tossina alfa.

Discussione e conclusioni

Le indagini virologiche condotte hanno confermato la presenza e l'importanza epidemiologica di ovini reservoir asintomatici per OvHV-2. In particolar modo, il virus è risultato più diffuso fra le pecore di razza sopravvissana (6/10), rispetto ai soggetti di razza olandese (1/9). È ipotizzabile che la tosatura, effettuata circa un mese prima della comparsa dei sintomi nei banteng, potrebbe aver costituito l'evento stressante, alla base della riattivazione in soggetti portatori di virus in forma latente.

Non si può tuttavia escludere la presenza di un numero superiore di soggetti portatori rispetto a quello osservato, in considerazione della possibile presenza di virus al di sotto dei limiti di rilevabilità del metodo impiegato. I test sierologici in corso di esecuzione potranno integrare tale riscontro. Tenuto conto anche del fenomeno della latenza, non è pertanto ipotizzabile la possibilità di riformare esclusivamente i soggetti in cui sia possibile rilevare la presenza del genoma virale. Il breve periodo trascorso dall'ultimo episodio di FCM non consente di escludere la possibile comparsa di altri casi, considerato che nella specie bovina sono stati descritti periodi di incubazione anche di oltre 200 giorni (7).

Successivamente alla diagnosi eziologica, al fine di limitare l'eventuale insorgenza di ulteriori casi, sono state adottate misure di biosicurezza volte ad evitare ogni possibile contatto diretto o indiretto delle specie clinicamente sensibili con personale, alimenti, materiali o fomite contaminati. In attesa di allontanare gli ovini dalla fattoria didattica, sono state sospese le visite guidate alla stessa, al fine di evitare possibili contaminazioni ad opera dei visitatori con secreti ed escreti di soggetti eliminatori di virus. Di fatto, la sola separazione fisica delle specie reservoir dell'infezione da quelle sensibili alla forma clinica, non costituisce una misura sufficiente per evitare la diffusione dell'infezione, stante la continua circolazione di specie sinantropiche fra ed attraverso le differenti aree del parco zoologico.

Casi di FCM sono stati già descritti in banteng, tuttavia, ad eccezione di una segnalazione del 1980, esclusivamente su base clinica e anatomo-istopatologica (2), per la quale non è stato rilevato il virus in causa, non risultano ad oggi altre segnalazioni di SA-FCM in soggetti mantenuti in cattività.

Al momento, sono in corso ulteriori approfondimenti volti ad accertare il grado di diffusione dell'infezione da OvHV-2 nei differenti gruppi di artiodattili mantenuti presso il Bioparco, al fine di valutare anche il rispettivo ruolo epidemiologico al momento ancora poco conosciuto. Considerata la presenza nel Bioparco anche di specie possibili reservoir di altri virus responsabili di FCM, quali AIHV-1, Caprine Herpesvirus 2 (CpHV-2), FCM virus isolato dal Cervo dalla coda bianca (MCFV-WTD) (8), si rende necessario uno studio complessivo del problema per ridurre quanto più possibile eventuali perdite di soggetti di alto valore naturalistico.

Questo episodio conferma che l'allevamento di specie clinicamente sensibili alla FCM insieme con specie reservoir, costituisce una pratica di gestione sanitaria non appropriata ed un rischio non irrilevante, soprattutto per quelle specie soggette a programmi di conservazione.

BIBLIOGRAFIA

1. M. Campolo, MS. Lucente, V. Mari, G. Elia, A. Tinelli, P. Laricchiuta, M. Caramelli, D. Nava, C. Buonavoglia, N. Decaro. 2008 Malignant catarrhal fever in a captive American bison (*Bison bison*) in Italy. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20: 843 – 846;
2. Hatkin J. 1980 - Endemic Malignant Catarrhal Fever at the San Diego Wild Animal Park. *J. of wild. Dis.* Vol. 16, No.3 p 439 - 443
3. C. Letellier, P. Kerkhofs 2003. Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhea virus. *Journal of Virological Methods* 114 pp 21-27
4. Manna G., Scicluna M.T., Damiani A., Lorenzetti R., Palmerini T., Letizia E., Caciolo D., Amaddeo D., Autorino G.L. 2007. Messa a punto di un protocollo di real time PCR per la diagnosi delle infezioni da Alphaherpesvirus dei ruminanti. *Atti del IX congresso Nazionale S.I.Di.L.V.* pp.37-38
5. A. Martucciello, C. Marianelli, M. Captano, S. Atarita, D. Alfano, G. Galero. 2006. Indagine su un focolaio di Febbre Catarrale Maligna nella bufala mediterranea (*Bubalus Bubalis*). *Large Animal Review*, Anno 12, n. 5 pp 21-24;
6. G. Russel, J. Stewart, D. Haig 2009. Malignant Catarrhal fever: A review; *The Vet. J.* 179 324-335;
7. Stöber, M. Febbre Catarrale Maligna. In: Diktsen, G., Grunder, H.D., Stöber, M. *Medicina Interna e Chirurgia del Bovino. Le point Vétérinaire Italie srl, Milano* 2004 pp. 1217 – 1221 ;
8. H. Li, N. Dyer, J. Keller, T. Crawford 2000 Newly Recognized Herpesvirus Causing Malignant Catarrhal Fever in White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*). *J. of Clinical Microbiology*, Apr., p. 1313–1318

INDAGINE SULLA PREVALENZA DELLA LEPTOSPIROSI NEI CINGHIALI DEL CENTRO-NORD SARDEGNA

¹Piredda I., ¹Palmas B., ¹Noworol M., ¹Canu M., ¹Fiori E., ²Picardeau M., ¹Tola A., ¹Pintore A., ¹Ponti N.

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Dipartimento Sanità Animale, Laboratorio Sierologia e Gestione Tecnica Piano eradicazione ruminanti, Sassari

²Institut Pasteur, Unité de Biologie des Spirochetes, Paris

Key Words: Leptospirosi, diagnostica, suini

ABSTRACT

The aim of this study was to value the prevalence of *Leptospira* pathogenic in samples of wild boar (*Sus scrofa*) collected during the 2009-2011 hunting season in Sardinia. A total of 767 samples (419 kidneys, 73 urine and 233 serum) were analysed (Tab.1). *L. interrogans* serovar Pomona was isolated in 34 samples of 492 (7%), while 244 samples of 419 (58%) were PCR positive for the presence of species-specific genes of rRNA 16S. 233 serum samples were tested for specific antibodies by Microscopic agglutination test (MAT) and 67 were titrated. The serovar Grippotyphosa and Pomona were the most representative. The isolates were tested by Institute Pasteur (Paris) by partial *rrs* gene sequencing, VNTR and PFGE.

INTRODUZIONE

La leptospirosi è una zoonosi causata da una spirocheta patogena del genere *Leptospira*. È una malattia infettiva che colpisce moltissime specie di mammiferi domestici e selvatici, con differenti manifestazioni a seconda del ceppo e della specie coinvolti (1). L'agente eziologico, dotato di scarsissima resistenza nell'ambiente esterno, mantiene il suo ciclo vitale grazie a ospiti serbatoio specifici per ogni sierovariante, nei quali l'infezione esita spesso nello stato di portatore, caratterizzato da assenza di sintomi e presenza persistente della spirocheta in alcuni organi/apparati. In Italia la sieropositività alla leptospira nei cinghiali (*Sus scrofa*) è stata documentata già quindici anni fa (2,3). In Sardegna, la specie nella quale la leptospirosi esplica principalmente la sua azione patogena è quella suina. I danni e le perdite economiche per gli allevatori sardi sono ingenti soprattutto perché solitamente non viene praticata la vaccinazione. Lo studio da noi intrapreso ha avuto come fine ultimo valutare il potenziale ruolo di questi animali selvatici come serbatoi di leptospire nel centro-nord Sardegna, attraverso l'evidenziazione di anticorpi su siero mediante il Test di Microagglutinazione (MAT), del DNA nei reni mediante Reazione a Catena della Polimerasi (PCR) e dei microrganismi mediante esame colturale.

MATERIALI E METODI

Gli studi sono stati condotti in una regione ubicata nel centro della Sardegna settentrionale chiamata Goceano il cui territorio si estende per 481 km. L'indagine è stata effettuata su campioni d'organo urine e siero, raccolti da animali abbattuti nella zona di studio durante il periodo venatorio 2009/2010 e 2010/2011 (Fig. 1). I cinghiali sono stati classificati per età (in base all'esame della dentatura), sesso e luogo di morte. Nel primo anno sono stati raccolti 191 campioni di rene, 52 di urine e 43 di siero. L'anno successivo sono stati raccolti 228 reni, 21 urine e 190 sieri (Tab.1). La determinazione anticorpale su siero è stata condotta mediante MAT, utilizzando un pannello di 9 leptospire come antigene (Tab.2). Gli antigeni sono stati

coltivati in terreno di base Ellinghausen-MacCullough-Johnson-Harris (EMJH-Difco, Detroit, Michigan, USA) ed il test è stato eseguito mediante procedura riportata da Faine *et al.* (4).

Tab. 1 Campioni esaminati nelle due stagioni venatorie

MATRICE	2009/2010	2010/2011
RENI	191	228
URINE	52	21
SIERI	43	190
TOT. CAMPIONI	286	439

Tab. 2 Elenco ceppi usati come antigeni nella MAT

<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno n°224
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moska V n°54
<i>L. interrogans</i>	Australis	Bratislava	Riccio 2 n°47
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona n°222
<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Mitis Johnson n°6
<i>L. interrogans</i>	Icterohaem.	Icterohaem.	RGA 20
<i>L. interrogans</i>	Icterohaem.	Copenhageni	Wijnberg n°1
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Canicola	Alarik n°2
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Ballum	Mus 127 n°217

Per le urine e gli organi (precedentemente omogenati) invece, è stata eseguita la semina in tre tubi contenenti terreno EMJH semisolido (0,1% agar). L'incubazione delle colture avviene in condizioni di aerobiosi a 28-30°C in termostato al buio. Gli stessi substrati sono stati utilizzati per la diagnosi molecolare diretta mediante PCR, in cui una coppia di primers (Lepat1 e Lepat2) amplificano una parziale sequenza del gene 16S rRNA di leptospira lunga 324 bp rilevabile mediante elettroforesi in gel d'agar al 2% (5). Le leptospire isolate mediante coltura invece, sono state tipizzate mediante indagini VNTR (Variable Number Tandem Repeats) e l'ausilio della PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis). Dopo l'iniziale estrazione del DNA dal microrganismo utilizzando un apposito kit (Qiagen), si applica il protocollo di amplificazione mediante cinque set di primers: VNTR-4, VNTR-7, VNTR-10, VNTR-Lb4 e VNTR-Lb5 (6). I primi tre vengono applicati alle genospecie *interrogans*, *kirschneri*, *noguchi* e *borgpetersenii*, mentre gli ultimi due sono specifici per la sola genospecie *L. borgpetersenii*. Ciascuna coppia di primers individua un set di bande specifico per quel serovar. Infine, la macrorestrizione genomica con taglio da parte di endonucleasi di restrizione seguita da una elettroforesi in campo pulsato (PFGE), permette la clusterizzazione del microrganismo.

RISULTATI

Dai 492 campioni sottoposti ad esame colturale sono stati isolati complessivamente 34 ceppi (prevalentemente da

rene) i quali, a seguito di tipizzazione biomolecolare ad opera dell'Unité de Biologie des Spirochetes Institut Pasteur di Parigi, sono risultati essere tutti genospecie *L. interrogans* serovar Pomona. Dei 233 campioni di siero pervenuti, 67 sono risultati positivi alla MAT (29%) e quindi sottoposti a titolazione con i ceppi elencati in Tab. 4. Le sierovarianti Grippotyphosa e Pomona si sono rivelate le più diffuse rispettivamente con il 62 e 60%, in accordo con i risultati ottenuti dalla tipizzazione molecolare. A seguire Bratislava con il 40% e Hardjo con il 30% (Fig. 2). Infine, dei 492 campioni totali, 426 sono stati testati mediante PCR, rivelando una positività del 57% (Tab. 3). Dei 421 capi abbattuti 213 erano femmine e 203 maschi, di cui perlopiù di età > 30 mesi.

Tab. 3 Elenco attività diagnostiche

	Camp. Esam.	Camp. Pos.	Camp. Esam.	Camp. Pos.	Camp. Esam.	Camp. Pos.
	419	33	419	242	-	-
	73	1	7	2	-	-
	-	-	-	-	233	67
	492	34	426	244	233	67

Tab. 4 Titolazioni sierologiche (Ha=hardjo; Gr= grippotyphosa; Br=Bratislava; Po=pomona; Ta=tarassovi; Ic=icterohaemorrhagiae; Cop=copenhageni)

	Ha	Gr	Br	Po	Ta	Ic	Cop
	12	15	10	12	4	6	1
	5	15	11	11	4	4	1
	2	7	2	8	2	1	
	1	1	3	4	4		1
		2		5	3		
			1	2			
	20	40	27	42	17	11	3

DISCUSSIONE

Gli esami batteriologici e molecolari effettuati a partire da organi ed urine delle ultime annate venatorie, pongono l'accento sulla suscettibilità e sul probabile ruolo di questi animali selvatici nel mantenimento e nella trasmissione dell'infezione alle specie domestiche allevate allo stato semi-brado con cui condividono lo stesso habitat. Effettivamente la leptospirosi resta una patologia sottostimata in quanto prevalgono le forme silenti o le forme cliniche con sintomatologia simil-influenzale che vengono spesso risolte con la terapia antibiotica. L'applicazione di alcune misure di tipo profilattico, come l'utilizzo di vaccini sia per le categorie professionali più esposte che per gli animali maggiormente a rischio, come anche l'abolizione della promiscuità tra specie animali diverse e tra domestici e selvatici, ridurrebbe sicuramente la prevalenza delle spirochete nel nostro territorio. I cinghiali inoltre potrebbero giocare un ruolo chiave nell'epidemiologia della *L. interrogans*, perché la densità di queste specie selvatiche nelle nostre aree è molto elevata (7-10 capi/100ha); non devono quindi essere trascurati gli aspetti legati alla sanità pubblica oltre ai danni che questa specie arreca alle attività e alle produzioni agricole, alle fitocenosi forestali, alle specie ornamentiche che nidificano a terra e gli incidenti stradali provocati.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Levett PN. *Leptospirosis*. Clin. Microbiol. Rev. 2001; 14: 296-326.
- 2) Farina R., and Andreani E. *Leptospirosi degli animali selvatici in Italia*. Archivio Veterinario Italiano. 1970; 21: 127-141.
- 3) Tagliabue S., and Farina R. *Inchiesta sieroepidemiologica sulla diffusione delle leptospire tra gli animali domestici ed alcune specie selvatiche*. Selezione Veterinaria 1995; 36: 941-952.
- 4) Faine S., Adler B., Bolin C., and Perolat P. *Leptospira and leptospirosis*, 2nd Edition MediSci, Melbourne, Australia. 1999; 180.
- 5) Murgia R., Riquelme N., Baranton G. and Cinco M. *Oligonucleotides specific for pathogenic and saprophytic leptospira occurring in water*. FEMS Microbiol. Lett. 1997; 148: 27-34.
- 6) Salaün L., Merien F., Gurianova S., Baranton G., and Picardeau M. *Application of Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for Molecular Typing of the Agent of Leptospirosis*. J. of Clin. Microbiol. 2006; 3954-3962.

Fig. 1 Areali del Goceano interessati allo studio.

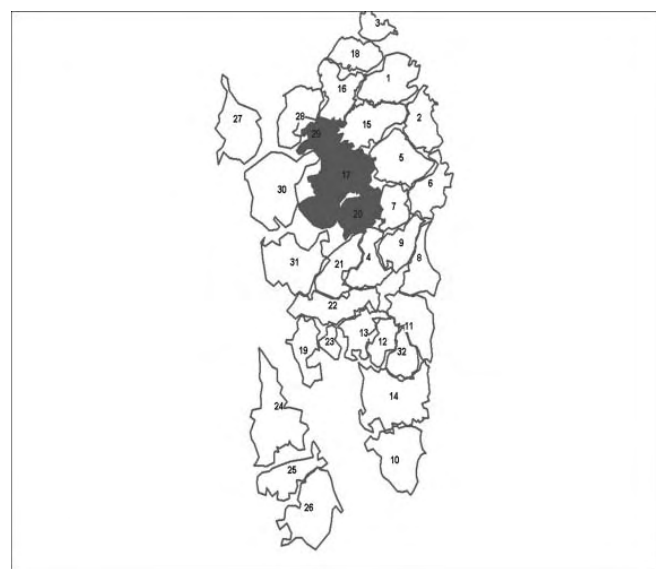
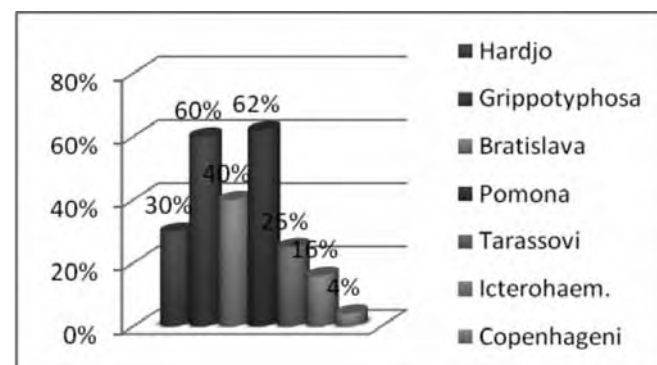


Fig. 2 Prevalenza dei sierotipi riscontrati alla MAT



GOING BEYOND THE LAW FOR THE MANAGEMENT OF AN OUTBREAK OF *LEPTOSPIRA* SEROVAR *HARDJO* INFECTION IN A LARGE INTENSIVE DAIRY CATTLE HERD

¹Scicluna M. T., ²Rinaldi G., ³Della Marta U., ¹Simula M., ¹Caprioli A., ¹Rosone F., ¹Manna G., ¹Autorino G.

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Direzione Operativa Diagnosi delle Malattie Virali, Via Appia Nuova 1411, Roma. ²Local Veterinary Services Roma D, ³Latium Regional Veterinary Services

Key Words: *Leptospira* serovar *hardjo*, management, laboratory diagnosis

ABSTRACT

In a large dairy cattle herd experiencing hypofertility problems, circulation of *Leptospira hardjo* was serologically confirmed by the high prevalence levels in different production units. A herd programme, including supplementary measures to those already prescribed in the current Regulation, was applied to control the infection as well as to minimize economic losses. The programme, based on vaccination, antibiotic treatment and biosecurity measures, resulted successful in preventing leptospira circulation, as demonstrated by the negativity in Real Time PCR of the urine of animals in the different productive units and the microagglutination test of the sera of new born and sentinels animals, allowing the restrictions to be lifted from the farm.

INTRODUCTION

Blood samples were collected from an intensive dairy cattle farm to investigate if the hypofertility problems reported in the herd were due to infectious agents. The results returned by the diagnostic laboratory were those of a serological positivity to *Leptospira hardjo*, with titres indicative of its possible active circulation. In Italy, diagnosis of this infection in productive domestic animals determines the application of severe sanitary measures, including animal movement restriction, prescribed in the Ministerial Regulation dated 4th September 1985 – Prophylaxis of animal leptospirosis, lifted only after the removal of all seropositive animals. The adoption of such measures within highly productive farms implies huge economic losses. Therefore, on the basis of the experience reported in literature by other researchers (2,3,4,5), the Local Veterinary Authorities (LVA), in collaboration with the Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS), applied a herd control programme including supplementary measures to those already present in the current Regulation, based on the combination of preventive, treatment and biosecurity measures, specifically aiming at the sterilization of carriers and prevention of new cases of infection. The primary objective of this plan was to accelerate the control/eradication of the infection which was evaluated by monitoring the absence of its circulation with the aid of serological and molecular techniques and not as requested by the Regulation, through the sole removal of the seropositive animals. Following is the description of the supplementary measures adopted and the actions applied for the assessment of the effectiveness of the control protocol.

MATERIALS AND METHODS

In a large intensive dairy cattle farm, of around 600 lactating animals, blood samples were collected from 17 problem animals to serologically investigate if any infectious agents were the cause of the hypofertility problems the herd was experiencing. The results returned by the laboratory were indicative of *Leptospira* serovar *hardjo* circulation.

Following the notification of these results to the LVA, the latter proceeded with the immediate application of preliminary preventive measures by imposing animal movement restriction. In parallel, in conjunction with the IZS, a serological investigation was undertaken to verify if the infection was actively circulating by establishing the levels of prevalence in the different productive units, as well as, the titre values of the positive samples: the random sampling scheme (Table 1) adopted, allowed to estimate a prevalence of at least 50%, with a standard error of 10% and a confidence interval of 95%. Animals less than six months of age were not tested because of possible interference of maternal antibodies. The serological method used throughout the episode was the microagglutination test (MAT) described in the OIE manual, employing the serovar *hardjo*. Samples were screened at the dilution of 1/100 and if reactive they were re-examined for an end-point titre, using a two fold dilution to up to 1/1600. A sample was considered positive when presenting a titre \geq 1/100. This value was chosen because of the low reported sensitivity of the MAT (6). Furthermore, the herd had no vaccination history which could influence the titres found.

Table 1 – Sample scheme for the serological survey

Productive Unit	Consistency	Examined (positive)	Positive	N° of animals (Titres)	Estimated prevalence %
Heifers	60	34 (5)	5	1(1/100) 1(1/200) 3(1/400)	15
Pregnant Heifers	160	54 (38)	38	27 (1/100) 3(1/400) 8(1/200)	70
Dry cows	140	51 (37)	37	29(1/100) 8(1/200)	73
Primipare	120	48 (26)	26	26 (1/100)	54
Pluripare	160	60 (35)	35	34(1/100) 1(1/200)	58
Fresh Lactating cows	50	33 (12)	12	10(1/100) 2(1/200)	36
Problem animals	80	44 (25)	25	25 (1/100)	57
Sick bay	20	17 (7)	7	7 (1/100)	41

On verifying an active circulation of leptospria infection, the LVA proceeded with adopting the measures contained in the Regulation. However, due to the size of the farm and the high levels of infection detected, the LVA together with the IZS, drew up an additional herd control programme, approved by the Regional Veterinary Services, for the management of the infection and which the owner also undersigned. The supplementary control plan contained the following points:

- Preventive measures, based on the use of a vaccination programme to limit new cases contributing to the further spread of leptospirosis. The vaccine employed contained

serovar *hardjo* (produced by the IZS of Umbria and Marche) and was administered to all animals above the age of six months, followed by a booster, 15 days later. Revaccination was recommended every 4 months, to ensure a protective immunity especially in herds highly at risk of infection.

- Antibiotic treatment was adopted to sterilize carrier animals, therefore eliminating the primary source of infection and was carried out as prescribed in literature (1,3). Two different types of antibiotics were chosen for economical reasons and because of an easier management of the animals in treatment, in that only the young animals and the males were reared individually and therefore easier to capture for repeated administrations. The more economical antibiotic, Penistrep®, 25mg/kg b.w., was used in these animals for 3 consecutive days. Also, to avoid any impact of this action on the principal farm income, i.e. the sale of milk, antibiotics were administered when the producing animals had dried off. The operation was conducted to ensure that all the animals of the same group received treatment at the same time, to avoid infection of the seronegative subjects, after the disappearance of the effect of treatment. These animals received a single dose of 20 mg/kg b.w., a long acting oxytetracyclin (Duphaciclina 300 LA®). The antibiotic treatment programme ended when all the lactating animals, upon drying, had also undergone treatment.

- Biosecurity measures, in addition to those already present in the Regulation, were aimed at further limiting the presence of leptospira in the environment and consisted in: isolation of the different units and their drinking systems in function of whether these had undergone antibiotic treatment and complete vaccination; exclusive use of artificial insemination; systematic draining of paddocks to avoid water and urine stagnation; confinement and feeding and milking last of untreated animals; adoption of individual protective clothing and measures to reduce the risk to the professional categories.

After the conclusion of the adoption of the control plan, actions were set up to verify their effectiveness, and these consisted in the microbiological examination of the urine samples collected from the animals in the different productive units. A sampling scheme similar to the one described for the serosurveillance (Table 2) was employed.

Table 2 - urine sampling scheme in the different productive units

Productive Unit	Consistency	Examined
Fresh lactating cows	150	59
Pregnant heifers	70	41
Heifers	260	71
Dry cows	113	52
Lactating cows	100	49

The urine samples were examined using a SYBR Green Real

Time PCR, specific for pathogenic *Leptospira* (7). The advantage of this test is that it can be used to identify the carrier state even in a serologically positive animal and when compared to the microbiological isolation, it is fast and highly specific. Although the type of biological samples examined could cause problems of reaction inhibition, using it at herd level, increases the sensitivity of the method.

In addition to the microbiological survey carried out on the

adult animals, a serological control was carried out on the animals born after the conclusion of the programme. The same animals were also used to form groups of seronegative sentinels placed in the productive units for the detection of an active circulation. The number of sentinel animals used in the different productive units aimed to reveal an infection prevalence of 5% (IC 95%). These animals were serologically retested at the end of their in-contact period, lasting approximately two months, thus ensuring exposure, incubation period and also the production of a detectable serological response.

RESULTS AND DISCUSSION

The seroinvestigation carried out to estimate the levels of infection and titres in the different productive units is reported in Table 1. Considering the sensitivity of the test, all the units except for the heifers presented high prevalence, even if titre were generally low, apart for the ones detected in this unit registering the lowest prevalence, where on the contrary, the few reacting animals had medium level titres. The results of the serosurvey demonstrated that leptospira infection was endemic in the farm and because of the size of the herd, a large number of animals were seropositive. Therefore, according to the present Regulation, lifting of the restrictive measures would have been possible only after the removal of all these animals and this would have caused not only the loss of genetically valuable animals but also requested an enormous financial and time-consuming commitment from the owner, with the risk of causing his economic failure.

The control/eradication of endemic leptospira in dairy farms can be achieved by the combination of vaccination, antibiotic treatment and application of specific biosecurity measures, and the herd programme adopted can be evaluated by monitoring the herd for infection circulation. These measures when adopted within this intensive dairy farm were considered as successful on the basis of the interruption of the leptospira infection in the different production units, as demonstrated by the negative results obtained for the urine samples and the seronegativity of the sentinels after their in-contact period with serological positive animals. Further evidence of the efficiency of the control programme was also the seronegativity of all animals born after the conclusion of the adoption of these measures. Following this evidence, the VLA lifted the restrictions.

The success of the control programme is also that, although, it was applied where circulation of leptospira infection through direct transmission was a highly probable event, because of the close proximity with which the animals are reared, this was stopped.

In the future, to avoid the loss of the initial investment, it is important that the farm continues applying preventive/control measures, as well as monitoring, to ensure that the infection does not reappear.

The time employed to reach these results was around eight months, and was relatively short when compared to the that necessary if the provision of removing all serological animals had been applied

In terms of the economic involvement in applying the present herd control programme, while it could be considered high in the short term, because of the immediate costs of the vaccination and the antibiotic treatment, it is absolutely less than what the farmer would have spent if the Regulation would have been applied rigidly, not only because the normal commercial activity (sale of milk and animals)

of the herd would have been impeded until the sanitary restrictions continued being applied, but for the costs involved in removing the seronegative animals. Although, detailed cost-benefit analysis are necessary to verify this, the psychological benefit in lifting the sanitary measures from the farm, as early as possible, is definitely a positive advantage in this analysis.

Moreover, because leptospirosis is a public health issue, if the owner is unaware of the problem, the farm workers will not be aware of the risk of infection and on the preventive measures they should adopt.

From this experience, as well as those reported also by various breeding associations of dairy cattle, in other countries, the Italian law should be revised to permit a different approach for the control and eradication of the *Leptospira* infection in productive animals, not only based on the removal of

seropositive animals, but aided by the adoption of measures similar to those described in this herd control programme and verified by the set-up of a serological/microbiological monitoring of the herd. The adoption of such a herd control programme would be of benefit for both the farmers as well as the Veterinary Authorities, in that they would have more instruments in the control of this infection.

BIBLIOGRAPHY

- 1) Alt DP, et al., 2001. J Am Vet Med Assoc. 1;219(5):636-9.
- 2) Bolin CA, Alt DP. 2001. Am J Vet Res. 62(7):995-1000.
- 3) Cortese VS, et al., 2007. Vet Ther. 8(3):201-8.
- 4) Little TW, et al., 1992. Vet Rec. 1;131(5):90-2.
- 5) Little TW, et al., 1992. Vet Rec. 24;131(17):383-6.
- 6) Levett PN Clin. Microbiol. Rev. 2001 Apr.; 296-32.
- 7) Ahmed A, et. al. 2009. PLoS One 4: Vol 4, Issue 9:1-8

SVILUPPO DI UNA PROTEINA CHIMERICA BASATA SULLE PROTEINE GP51 P24 DEL VIRUS DELLA LEUCOSI BOVINA ENZOOTICA

De Giuseppe A., Casciari C., Ferrante G., Bazzucchi M., Forti K., Torresi C., Rizzo G., Feliziani F.

⁽¹⁾Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

Key words: BLV, ricombinante, chimera

SUMMARY

Bovine leukemia virus (BLV) is a retrovirus that induces a chronic infection in cattle. Eradication and control of the disease is based on early diagnostic and segregation of the seropositive animals.

An Elisa test was developed: it was based on a Chimeric recombinant antigen containing the expression of the two major immunogenic protein of the BLV respectively named gp51 and p24. The CHIMERA ELISA revealed high values of sensitivity and specificity and, therefore, can be effectively used for the diagnosis of Enzootic Bovine Leucosis.

INTRODUZIONE

La Leucosi Bovina Enzoitica (LEB) è una malattia contagiosa che colpisce i bovini dando luogo ad una neoplasia maligna letale a distribuzione organica sistemica. L'agente eziologico appartiene alla famiglia delle Retroviridae che raccoglie virus in grado di causare forme tumorali nei mammiferi, negli uccelli e nei rettili. In questa famiglia è compreso anche il virus della human T-cell leukemia molto simile al quello della LEB. Il virus della LEB (BLV) può determinare, dopo un lungo periodo di incubazione, un linfosarcoma. La risposta anticorpale umorale indotta dal virus non blocca la sua replicazione nell'ospite.

Dal 1996 la LEB è oggetto di un piano nazionale di eradicazione basato sul controllo sierologico individuale dei bovini di età superiore a 12 mesi e sulla macellazione dei capi risultati sieropositivi.

Le norme nazionali che regolano il Piano di eradicazione della Leucosi Bovina Enzoitica e gli scambi intracomunitari (DM 2/05/1996 n°358 e DL del 22/05/1999 n°196) contengono alcuni allegati tecnici in cui sono dettagliatamente descritte le prove diagnostiche da utilizzare nell'applicazione del piano: l'immunodiffusione in gel di agar (AGID) e l'ELISA. La tecnica AGID è la prova "storica" su cui sono stati basati i piani di profilassi in Italia, ma recentemente il test maggiormente utilizzato è quello immunoenzimatico.

Il Centro di Referenza Nazionale per lo studio dei Retrovirus correlati alle patologie infettive dei Ruminanti (CEREL) ha già da tempo messo a punto un kit ELISA *home made* basato su un antigene ricombinante che ha dato prova di ottime performance diagnostiche.

Questo test è usato nella routine dei laboratori di sierologia afferenti all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche nell'applicazione dei piani di sorveglianza per LEB, ma è anche validamente usato da parte del CEREL per scopi di ricerca o per confermare risultati di prima istanza espressi da altri laboratori nel territorio nazionale. La mancanza di un Gold Standard inoltre, richiede un'attenta valutazione dei casi dubbi che possono essere definitivamente valutati solo attraverso l'impiego di diverse prove diagnostiche.

Da tempo il CEREL ha adottato la procedura di testare i

campioni di difficile interpretazione con diverse metodiche ivi comprese quelle di tipo biomolecolare (PCR tradizionale, Real Time...), ma questo non sempre è possibile, sia perché queste tecniche a loro volta non garantiscono un'assoluta veridicità del risultato, sia perché talvolta il volume dei campioni o il loro stato di conservazione non consente di effettuare più test.

Da tutti questi motivi nasce l'esigenza di avere disponibile un test affidabile in termini di sensibilità, ma che possa anche garantire un livello di specificità tale da aiutare la valutazione diagnostica. Questo obiettivo verosimilmente può essere raggiunto impiegando antigeni e reagenti diversi da quelli che costituiscono i kit disponibili in commercio.

I riferimenti legislativi internazionali come anche i trattati riguardanti la standardizzazione delle tecniche ELISA (es. Manuale OIE) fanno riferimento essenzialmente alla proteina gp51 del BLV come antigene su cui devono essere basati i kit da impiegare nella diagnosi indiretta di BLV. D'altro canto il virus esprime anche altre proteine fortemente immunogene in grado di essere adeguatamente rilevate come ad esempio la proteina p24 che in diversi lavori scientifici è stata utilizzata come base per test immunoenzimatici.

Si è quindi pensato di associare queste due proteine in un unico test ELISA basato su un antigene costruito sinteticamente in modo da esprimere le qualità immunogene della gp51 e della p24 per mantenere la sensibilità al livello già ottimale degli altri test ELISA ed avere maggiori garanzie da un punto di vista della specificità.

MATERIALI E METODI

Costruzione dei baculovirus ricombinanti: Tutti i primers impiegati sono stati designati in base alla sequenza nucleotidica del genoma del BLV riportata in letteratura (1). L'amplificazione del gene codificante la p24 del virus BLV è stata eseguita mediante l'impiego dei primers p24NN/F (5'-GCTAGCGCCGCGCCCAATCTCTGAAGGGAATC-3') p24NN/R(5'-GCTAGCGCCGCGCAGAAAGTGCAGGCTGTTTC-3'), che includono entrambi i siti di restrizione NgoMIV e NheI. L'amplicone ottenuto è stato clonato nel vettore procariotico pCR Blunt Vector (Invitrogen) generando così il plasmide pCR p24.

Il gene codificante per la gp51 è stato recuperato dal plasmide pB4gp51 dopo digestione con gli enzimi di restrizione XhoI e HindIII e purificato. I primers OpIE2 forward e reverse (Invitrogen) sono stati usati per amplificare il doppio tag V5-6xHis dal vettore pIZT/V5His (Invitrogen). La sequenza nucleotidica amplificata è stata clonata nel vettore pCR 2.1 e sequenziata. Il frammento Xho I - HindIII e l'inserito V5-His6, recuperato dal vettore pCR 2.1 a seguito della digestione con gli enzimi HindIII e NsiI, sono stati clonati nel vettore pFastBac 1 (Invitrogen) tagliato con le endonucleasi Sall e PstI, generando il plasmide pFB1gp51/V5-His.

Il gene codificante per la forma deleta della gp51 nella sua

parte C-terminale e il corrispettivo costruito $\Delta 175-268$ gp51-STH/pFB1 è stato ottenuto come riportato in precedenza (2). Per la costruzione del baculovirus transfer vector contenente la sequenza nucleotidica codificante per la proteina chimerica gp51/p24, l'inserto NgoMIV, derivante dalla digestione con l'omonimo enzima del plasmide pCRp24, è stato clonato nel costrutto pFB1gp51/V5-His digerito con l'endonucleasi di restrizione AgeI. L'esatto orientamento del clonaggio del gene p24 è stato poi verificato per mappa di restrizione. Allo stesso modo, il baculovirus transfer vector contenente l'informazione genetica relativa alla proteina chimerica $\Delta 175-268$ gp51/p24-STH, è stato ottenuto clonando l'inserto p24, derivante dal plasmide pCRp24 digerito con l'enzima NheI, nel costrutto pFB1gp51/V5-His digerito con lo stesso enzima.

Western Blotting: Aliquote di terreno colturale contenente le proteine chimeriche gp51/p24 e $\Delta 175-268$ gp51/p24-STH, sono stati sottoposti a SDS-PAGE ed immunoblotting. Le proteine sono state denaturate a 95°C per 5 min in presenza di buffer 4x NuPage (Invitrogen) e DDT 100 mM e sottoposte ad elettroforesi su gel Bis-Tris precasting NuPage al 10% in presenza del buffer MOPS. A seguito del trasferimento su membrane di PVDF, le stesse sono state incubate *over night* con un anticorpo monoclonale (Mab) anti-gp51 in grado di interagire con un epitopo lineare della gp51 ed un altro Mab specifico per la p24. La visualizzazione delle bande specifiche è stata effettuata in chemiluminescenza attraverso l'impiego di un Mab anti-mouse coniugato a perossidasi ed il reagente SuperSignal West Pico Chemiluminescence Substrate (Pierce Biotechnology).

ELISA test: La reattività delle proteine oggetto di studio verso i sieri derivanti da bovini infetti con il BLV, è stata valutata mediante analisi immunoenzimatica attraverso l'impiego di un kit ELISA *home made* messo a punto nei nostri laboratori (3). Inoltre, le caratteristiche antigeniche delle chimere sono state ulteriormente saggiare impiegando un anticorpo monoclonale (Mab) diretto verso l'epitopo conformazionale G della gp51. In questo caso, il Mab 2G7 impiegato nel kit *home made* è stato sostituito dal mab anti-G.

Produzione delle proteine chimeriche: Cellule d'insetto Sf21 sono state transfettate con il DNA bacmidico ricombinante impiegando il reagente Cell-fectin reagent (Invitrogen). Dopo 5 giorni di incubazione a 27 °C, il sovranatante è stato raccolto (P1 viral stock) ed impiegato per infettare 2×10^6 cellule Sf21 seminate in fiasca da 25 cm² in 5ml di terreno HYQ SFX-Insect serum-free medium (Hyclone), al fine di ottenere uno stock di virus ricombinanti ad elevato titolo (P2 viral stock). Tre ml di P2 viral stock sono stati poi utilizzati per infettare 300 ml di coltura di Sf21 (a concentrazione pari a 1.8×10^6 cellule/ml) cresciute in sospensione su bottiglie rotanti (P3 viral stock). Per la produzione degli antigeni ricombinanti le cellule Sf21 sono state cresciute su bottiglie rotanti (Corning Life Sciences) in presenza del terreno contenente 100 µg/ml di streptomicina, 0.25 µg/ml di anfotericina B, 100 UI/ml penicillina e 10 µg/ml di gentamicina. La sintesi delle proteine chimeriche su media scala, è stata eseguita mediante infezione con i vari P3 viral stock delle Sf21 seminate a 2×10^6 cellule/ml in 100 ml totali. I virus sono stati inoculati in quantità tale da avere molteplicità di infezione (MOI) nel range 0.1-1 particelle virali/cellula. Tre giorni dopo l'infezione, i terreni colturali contenenti le proteine ricombinanti, sono stati raccolti, centrifugati a 5,000 x g per 10 minuti e congelati a -20°C.

RISULTATI

Gli antigeni sintetici prodotti sono stati sottoposti ad indagini sierologiche impiegando, come confronto, un kit ELISA *home made* specifico per la gp51 del virus BLV ottenendo un'apprezzabile identità di risultati.

Maggiori informazioni sperimentali sono emerse dall'applicazione di un successivo test ELISA: il Mab 2G7 (in grado di legare un epitopo lineare della gp51), impiegato come *catcher*, è stato sostituito da un Mab anti-G (capace di reagire con un epitopo conformazionale della stessa proteina) confermando i risultati precedentemente ottenuti. L'indagine sierologica da sola non poteva fornire informazioni sulla corretta fusione tra la gp51 e la p24 né evidenziare eventuali variazioni della struttura della p24 come conseguenza della stessa fusione. Per questo motivo, le caratteristiche strutturali ed antigeniche delle proteine chimeriche sono state analizzate e valutate anche in Western blotting mediante l'impiego di due Mab specifici, uno per la gp51 (Mab 2G7) e l'altro per la p24. Entrambi gli anticorpi hanno rivelato la presenza di due proteine identiche con un peso molecolare rispettivamente di circa 80 kDa per la proteina di fusione gp51/p24 e approssimativamente di 60 kDa per la proteina $\Delta 175-268$ gp51/p24-STH (Fig. 1.A e B). Inoltre, l'ottima reattività tra chimere ed il Mab anti-p24 ha fornito la prova che la fusione tra le due differenti proteine è avvenuta secondo le modalità attese.

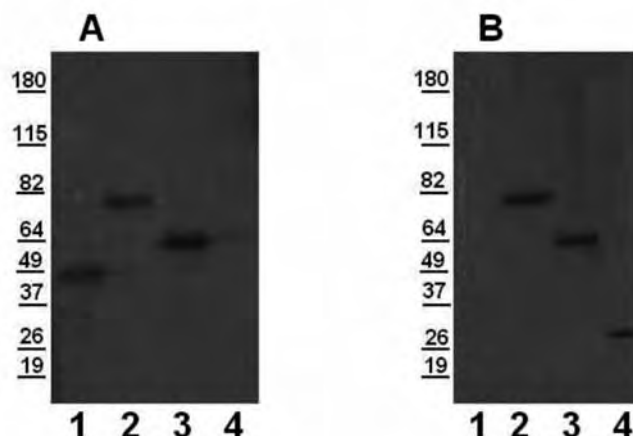


Figura 1. Analisi in Western blot dei terreni colturali contenenti le proteine ricombinanti chimeriche mediante l'impiego del Mab 2G7(A) e di un Mab anti-p24 (B). r-gp51 (linea 1); proteina chimerica gp51/p24 (linea 2); proteina chimerica $\Delta 175-268$ gp51/p24-STH (linea 3); proteina ricombinante p24 (linea 4).

DISCUSSIONE

Sulla base di precedenti acquisizioni scientifiche relative all'espressione delle proteine ricombinanti del virus BLV, per la costruzione di baculovirus ricombinanti sono state utilizzate due differenti forme della gp51 (la forma integra e la forma deleta, rappresentata dai primi 174 amminoacidi) mentre per la p24 è stato impiegato l'intero gene (2). Condizione obbligata nella costruzione delle chimere, è stata quella di porre il gene della gp51 a monte rispetto a quella della p24. In effetti, essendo la prima una glicoproteina necessita della sua Signal Sequence (rappresentata dai primi 33 amminoacidi) per la glicosilazione degli omonimi putativi siti aventi consensus ammino-acidico NXT/S. Comunque, non

avendo conoscenze in merito alla produzione di proteine derivanti dalla fusione di questi due antigeni si è preferito, in un primo tempo, realizzare una chimera costituita dai due geni sintetizzanti le proteine in forma integra al fine di preservare, almeno su base teorica, le caratteristiche antigeniche. Di seguito l'impiego della forma deleta della gp51, costruita ed espressa precedentemente nei nostri laboratori, ha permesso di ottenere una chimera in cui sono presenti nella sua parte C-terminale due tag (lo Strep-tag e la poli-Istidina) impiegabili per un'eventuale e/o necessaria purificazione della stessa. Entrambe le proteine chimeriche sono state espresse a livelli quali-quantitativi ottimali dove, almeno come risulta dai primi approcci sperimentali, entrambe hanno manifestato un identico grado di funzionalità.

Bibliografia

1. N. Sagata, T. Yasunaga, J. Tsuzuku-Kawamura, K. Ohishi, Y. Ogawa, Y. Ikawa. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukaemia virus: Its evolutionary relationship to other retroviruses, *Prot. Natl. Acad. Sci.* 82 (1985) 677-681.
2. Antonio De Giuseppe, Katia Forti, Francesco Feliziani, Giulio Severi, Monica Cagiola. Purification by Strep-Tactin affinity chromatography of a delete envelope gp51 protein of Bovine Leukaemia Virus expressed in Sf21 insect cells *Protein Journal* (2010) 29: 153-160.
3. A. De Giuseppe, F. Feliziani, D. Rutili, G.M. De Mia, Expression of Bovine Leukemia virus envelope glycoprotein (gp51) by recombinant baculovirus and its use in an ELISA test. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11 (2004) 147-151.

BACILLUS CEREUS NEL LATTE A MEDIA DURATA, COSTRUZIONE DI UN MODELLO DI MICROBIOLOGIA PREDITTIVA

Cosciani Cunico E.¹, Fierro A.², Finazzi G.¹, Ruggiero V.¹, Oliverio E.¹, Sabatucci G., Losio M. N.¹, Varisco G.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Reparto Tecnologie Acidi Nucleici Applicati agli Alimenti, Brescia

²Centrale del latte di Brescia s.p.a.

Keywords: *Bacillus cereus*, latte microfiltrato, microbiologia predittiva

SUMMARY

B. cereus is a spore forming gram-positive bacterium. The spores are insensitive to the pasteurization and can stick to all kinds of surfaces (1, 2). *B. cereus* psychotropic strains are isolated worldwide in milk production (3). In favourable conditions, the spores may germinate into vegetative cells capable of producing food poisoning toxins. For the bacterium characteristic, the micro-filtered pasteurized milk could generate a risk for the consumer. A predictive mathematical model was generated using the database ComBase (4) and validated through specific challenge test in milk.

INTRODUZIONE

Il *Bacillus cereus* (*B. cereus*) è un microrganismo gram-positivo, anaerobio facoltativo che si può trovare in forma vegetativa o in forma sporigena, è in grado di produrre diversi tipi di tossine dannose per l'uomo. Le spore del *B. cereus* si trovano nell'ambiente, il suolo può contenerne fino a 100000 ufc/g; le derrate alimentari possono essere contaminate attraverso il terreno (contaminazione diretta) o per contaminazione secondaria (veicolate da insetti). Gli alimenti dove è maggiormente rilevata la presenza del bacillo sono riso, verdure, prodotti carnei, ma anche latte e latticini (2). Negli impianti di trasformazione alimentare, si possono ritrovare le spore del bacillo in quanto sopravvivano senza nutrimento o acqua per anni, sono insensibili a trattamenti termici di pastorizzazione, $D_{92} = 96'$, alle radiazioni, ai disinfettanti e ad ambienti fortemente acidi o alcalini. Le spore sono altamente idrofobe e sono in grado di aderire a qualsiasi superficie. Tali peculiarità supportano dati scientifici che riportano come l'incidenza del batterio sia maggiore nel latte trattato termicamente che nel latte crudo (35-48% vs 9%) (1, 2). Se si trovano in substrati favorevoli, le spore sono in grado di germinare e, all'inizio della fase stazionaria di crescita batterica, producono tossine diarroiche o emetiche (2). Generalmente i ceppi di *B. cereus* sono mesofili, tuttavia, esistono ceppi del bacillo in grado di crescere a temperature inferiori a 8°C (3). In letteratura è riportato che, se il bacillo è presente nel latte pastorizzato, la sua concentrazione iniziale sia comunque contenuta, <10 ufc/ml, e che, se l'alimento è mantenuto ad una temperatura inferiore a 6°C per 5 giorni, la concentrazione rimanga sotto le 10⁵ ufc/ml, limite inferiore considerato dannoso all'uomo (4). Tuttavia nuove tecnologie di processo, come la microfiltrazione del latte pastorizzato, permettono di attribuire al prodotto una vita commerciale (*shelf-life*) più lunga, fino a 20 giorni di conservazione a temperature di refrigerazione. Considerando la necessità, per gli operatori del settore alimentare, di valutare il rischio microbiologico del proprio prodotto (Reg. CE 852 del 2004), e che, mentre i soli esami diagnostici sul prodotto finito non risultano idonei a tal fine (2), ma che, al contrario, l'utilizzo di modelli di microbiologia predittiva è avallato dalla normativa comunitaria (Reg. CE 2073 del 2005), scopo del lavoro è stato, quindi, la costruzione e la validazione di un modello matematico, alimento specifico, in grado di valutare l'evoluzione del *B. cereus* in funzione della temperatura di stoccaggio del latte. Il modello determina, nella matrice alimentare, il tempo necessario per arrivare al limite

minimo di concentrazione batterica potenzialmente dannosa per il consumatore (5). Ulteriore fine è stato quello di creare un foglio di calcolo, basato sul modello sperimentale, utile per le aziende alimentari e gli organi di controllo, che, potendo inserire un profilo termico di conservazione, ed una concentrazione batterica iniziale riuscirebbero a visualizzare, in grafico, l'evoluzione del batterio nel tempo.

MATERIALI E METODI

Modello matematico di microbiologia predittiva. Dalla banca dati ComBase (4) sono stati estratti 9 record riguardanti l'andamento della concentrazione di diversi ceppi di *B. cereus* nel latte pastorizzato in un *range* di temperatura variabile dai 5 ai 13°C. Il tasso di crescita dei batteri (*rate*) è stato calcolato utilizzando il *software* DMfit (4) su modello primario Baranyi (6). Il modello secondario, che relaziona la *rate* alla temperatura del substrato, è stato generato considerando che la radice quadrata della *rate* è direttamente proporzionale alla temperatura ambientale (fino all'*optimum* di crescita batterica). Le variabili del modello e i parametri statistici sono stati calcolati utilizzando la funzione di regressione dei dati del programma Excel® (7). L'accuratezza del modello è stata calcolata secondo le indicazioni di Pin e collaboratori (8).

Validazione del modello predittivo.

Preparazione del ceppo batterico. Tre ceppi di *B. cereus*, ATCC11778 (I), da collezione internazionale, 186656/2 (II), dalla collezione dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), isolato da ricotta, e il ceppo BC1 (III), isolato da latte microfiltrato della Centrale del latte di Brescia s.p.a., sono stati rivalizzati in terreno liquido (Brain Heart Infusion OXOID CM1032) con due passaggi successivi a 37°C per 24 ore. Le sospensioni batteriche, sotto forma di spora, sono state centrifugate a 12000 rpm per 5 minuti e ri-sospese in soluzione fisiologica sterile e successivamente titolate in terreno generico per la crescita batterica (PCA agar, Oxoid CM0325) incubato per 48 ore a 37°C. Le sospensioni dei ceppi di *B. cereus* sono state diluite in base dieci fino alla concentrazione presunta di 10⁵ ufc/ml.

Inoculo e incubazione delle unità di prova. Due lotti di produzione di latte pastorizzato e microfiltrato sono stati utilizzati per il calcolo della *rate* dei diversi ceppi di *B. cereus*. Per ogni lotto, sono state allestite 36 unità di prova, costituite da 50 ml di latte distribuito in provette sterili. Il volume di inoculo rispetto al volume di latte inoculato è stato pari all'1%. Le prime 10 unità di prova sono state inoculate con il ceppo I, le seconde con il ceppo II e le terze 10 con il ceppo III, le rimanenti 6 sono state utilizzate come controllo negativo. Le provette di latte inoculate, e non, sono state incubate a 8°C o a 12 °C, in funzione della psicrotrofia del ceppo, per 20 giorni.

Calcolo del tasso di crescita batterico. Le *rate* dei diversi ceppi batterici cresciuti nel latte microfiltrato, alle rispettive temperature di incubazione, sono state calcolate utilizzando il programma DmFit (4).

RISULTATI

Il calcolo della *rate* dei dati estratti dalla banca dati ComBase, con relativo record di riferimento, è riportato in tabella 1.

Tabella 1: legenda dei record della banca dati ComBase, le temperatura di conservazione del latte e la rate calcolata con il programma DmFit

combase record	temp	rate
BC_M3_05	5	0.01
BC_M2_05	5	0.01
BC_M4_07	7	0.03
BC_M2_07	7	0.03
BC_M1_09	9	0.03
BC_M1_11	11	0.05
BC_M2_11	11	0.05
BC_M1_13	13	0.12
BC_M2_13	13	0.13

L'equazione 1 descrive il modello secondario sperimentale, alimento specifico, generato dagli stessi dati e l'errore standard del modello.

$$Eq1 \quad \sqrt{rate}=0,026 \cdot Temp-0,025 \pm 0,036$$

Il fattore di accuratezza (Af) è risultato pari a 1,3.

I risultati del challenge test, con i relativi parametri del modello primario, sono riportati in tabella 2 e nelle figure 1 e 2.

Tabella 2: descrizione del ceppo, del lotto, della temperatura e dei parametri statistici del modello, fit, ES e R².

ceppo	lotto	temp	rate	se(fit)	R ² stat
BC I	1	8	0.017	0.742	0.853
BC II	1	8	0.009	0.536	0.906
BC III	1	8	0		
BC I	2	8	0.035	0.147	0.995
BC II	2	8	0.011	0.913	0.698
BC III	2	12	0.009	0.388	0.909

I grafici riportati nelle figure 1, 2 descrivono l'andamento della concentrazione del *B. cereus*, espressa come Log delle ufc per ml nel tempo, nei due lotti di latte microfiltrato a 8 e 12°C.

Nei campioni di controllo, analizzati all'inizio, a metà e a fine *shelf life*, il bacillo non è mai stato isolato.

fig. 1: concentrazione di *B. cereus* I, II, III (■) nel lotto 1 a 8°C. Fit dei dati dal programma DmFit (—) Δt=72h

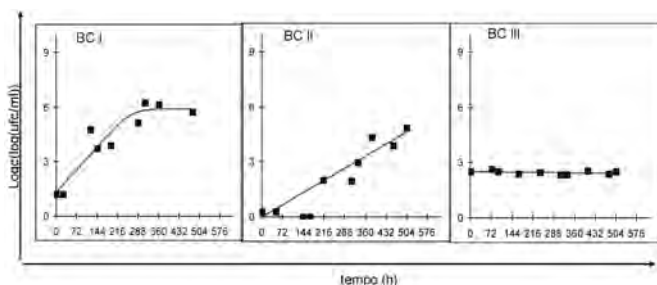
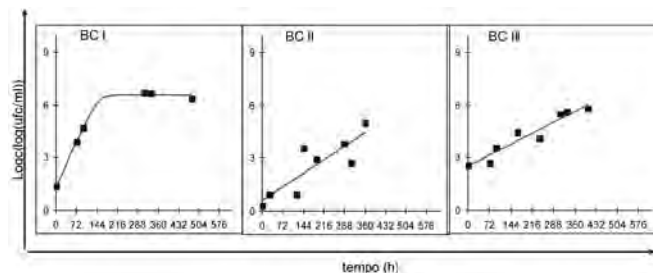
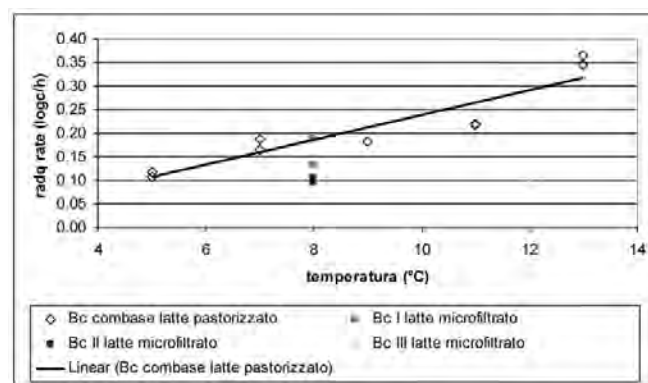


fig. 2: concentrazione di *B. cereus* I, II, III (■) nel lotto 2. Ceppi I e II incubati a 8°C, ceppo III a 12°C. Fit dei dati dal programma DmFit (—) Δt=72h.



Il grafico in figura 3 rappresenta il modello sperimentale e i dati del challenge test

fig 3: \sqrt{rate} di ceppi di *B. cereus* a diverse temperature. Ceppi dei record di ComBase (◇), ceppo BCI(●), ceppo BCII(♦), ceppo BCIII(▲).



DISCUSSIONE

Il modello sperimentale, se pur generato con un esiguo numero di dati, descrive l'andamento del *B. cereus* nel latte pastorizzato in modo soddisfacente ($Af=1,3$ $R^2=0,86$) in linea con i dati della letteratura (8). Il modello, alimento specifico, a differenza dei modelli disponibili in rete, generati da dati ottenuti in brodi colturali (4), risulta più affidabile (5). Infatti, ad influenzare la crescita batterica, non è solo la matrice alimentare, ma anche la presenza di popolazioni batteriche indigene. Anche la robustezza dei dati del *challenge test* ha permesso di ottenere risultati attendibili per descrivere l'andamento del bacillo nel latte pastorizzato e microfiltrato ($0.698 < R^2 < 0.995$), a diverse temperature, nel tempo. Confrontando i dati del *challenge test* con il modello sperimentale (fig. 3) si può affermare che esso genera una *safe prediction* e che la deviazione standard tra il dato sperimentale e quello predetto è tanto più grande quanto meno marcate sono le caratteristiche di psicrotrofia del ceppo. Si nota, infatti, come il ceppo BCIII non sia cresciuto a 8°C, mentre il ceppo BCI ha avuto una *rate* maggiore rispetto agli altri ceppi batterici (tabella 2). Infine, la generazione di un foglio di calcolo, basato sul modello sperimentale, potrebbe essere un mezzo utile agli organi di controllo e alle aziende alimentari sia per la valutazione del rischio microbiologico sia per determinare l'adeguatezza della *shelf life* attribuita al prodotto in funzione delle condizioni in cui è conservato. Come *output* del foglio di calcolo si può stabilire a quanti giorni il prodotto raggiunge una concentrazione tale da poter produrre la tossina.

BIBLIOGRAFIA

1. Shaheen R., Svensson B., Andersson M.A., Christiansson A., Salkinoja-Salonen M.S. 2010 "Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks" Food Microbiology, 27, 347-55.
2. Colavita G. 2008 "Igiene e tecnologie dei prodotti di origine animale" Edizione Point Veterinaire Italie.
3. Dufrenne J., Soentoro P., Tatini S., Day T., Notermans S. 1994 "Characteristics of *Bacillus cereus* related to safe food production" International Journal of Food Microbiology, 23, 99-109.
4. www.combase.cc.
5. Larsen H.D., Jørgensen K. 1999 "Growth of *Bacillus cereus* in pasteurized milk products" International Journal of Food Microbiology, 46, 173-176.
6. Baranyi J., Roberts T.A. 1994 "A dynamic approach to predicting bacterial growth in food" International Journal of Food Microbiology, 23, 277-294.
7. Ratkowsky D.A., Olley J., McMeekin T.A., Ball A. 1982 "Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures" Journal of Bacteriology, 149, 1-5.
8. Pin C., Sutherland J.P., Baranyi J. 1999 "Validating predictive models of food spoilage organisms" Journal of Applied Microbiology, 87, 491-499.

PREVALENZA E SIEROTIPI DI CEPPI DI *SALMONELLA* SPP. ISOLATI DA CARNI FRESCHE DI POLLO E TACCHINO IN VENETO (ITALIA), 2008-2010 – RISULTATI PRELIMINARI

Paiusco A.¹, Lettini A. A.², Barco L.², Comin D.¹, Mioni R.¹, Ricci A.²

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Struttura Complessa 1 – Microbiologia Alimentare – Legnaro (PD)

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi – Legnaro (PD)

Keywords: salmonella; carni fresche

ABSTRACT

Contaminated poultry meat has been identified as one of the major sources of salmonellosis. In a 3-years survey from January 2008 to December 2010, we isolated 325 *Salmonella* strains from poultry raw meat in the Veneto Region (Italy). Twenty-six *Salmonella* serovars were identified; predominant ones included Enteritidis, Coeln, Muenchen, Bredeney, Hadar and Saintpaul. This study confirms the efficacy of the application of control measures at primary production toward *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*, but outlines an opposite trend in the prevalence of other serovars, which could be considered in the revision of reduction targets.

INTRODUZIONE

Le infezioni da *Salmonella* rappresentano in Italia, come negli altri paesi industrializzati, una delle principali cause di malattia a trasmissione alimentare nell'uomo (1). Secondo il Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC) e l'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA), nel 2007 sono stati registrati 151.995 casi di salmonellosi nell'uomo in UE, che corrisponde ad un'incidenza di 31,1 casi su 100.000 abitanti (2). La trasmissione di *Salmonella* all'uomo avviene principalmente attraverso l'ingestione di alimenti di origine animale contaminati. Gli alimenti di origine avicola, in particolare, risultano essere la principale causa di infezione (1). La Comunità Europea ha emanato la Direttiva 2003/99/CE che indica la *Salmonella* e le salmonellosi quali agenti zoonotici da sottoporre a sorveglianza sanitaria (3); e con il Regolamento (CE) n. 2160/2003 stabilisce la necessità che sia fissato un obiettivo comunitario di riduzione della prevalenza di *Salmonella* nel pollame e che siano stabiliti i sierotipi di *Salmonella* rilevanti per la sanità pubblica; definisce inoltre l'obbligatorietà dell'assenza di *Salmonella* in 25 gr. nella carne avicola a partire dalla fine del 2010 (l'applicazione di tale criterio non è stata ancora attuata in attesa che vengano chiarite le modalità operative) (4). Per quanto riguarda i polli da carne, il piano nazionale di controllo ha avuto inizio nel 2009, mentre nei tacchini nel 2010; in entrambe le specie i sierotipi da sottoporre a controllo sono *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. Inoltre, per quanto riguarda il controllo sugli alimenti immessi al commercio, il Regolamento (CE) n. 2073/2005 prevede la ricerca di *Salmonella* su carne macinata e preparazioni a base di pollame destinate ad essere consumate cotte e prodotti a base di carne di pollame destinati ad essere consumati cotti. Per entrambe le tipologie di prodotti, *Salmonella* spp. doveva essere assente in 10 gr. di alimento su 5 unità campionarie fino al 31/12/2009, mentre a partire dal 01/01/2010 deve essere assente in 25 gr. di alimento su 5 unità campionarie (5). Lo scopo di questo studio è valutare la prevalenza e la distribuzione dei sierotipi di ceppi di *Salmonella* spp. isolati da carni fresche di pollo e tacchino analizzate in Veneto nel periodo 2008-2010, nell'ambito dei piani di autocontrollo aziendale, dopo i primi anni di applicazione dei piani nazionali di controllo negli allevamenti, ed in vista dell'applicazione di un criterio microbiologico alle carni fresche.

MATERIALI E METODI

Le indagini sono state condotte nel corso degli anni 2008, 2009 e 2010 su campioni di carni fresche di pollo e tacchino prelevati nell'ambito dei piani di autocontrollo aziendale, nelle province venete di Padova, Vicenza e Verona.

Un totale di 2.565 campioni di carne fresca e preparazioni di carne di pollo e tacchino sono stati sottoposti ad analisi microbiologica finalizzata alla ricerca di *Salmonella* spp..

I campioni sono rappresentati da 1.104 carni fresche di pollo, 973 preparazioni di pollo, 380 carni fresche di tacchino e 108 carni avicole (carni di specie non precisata tra pollo o tacchino). La ricerca di *Salmonella* spp. è stata eseguita nel rispetto della norma ISO 6579 che è basata su prearricchimento in Buffered Peptone Water, arricchimento in brodi selettivi (Rappaport Vassiliadis Broth e Muller-Kauffmann Tetrathionate Novobiocin Broth) e semina su terreni selettivi differenziali (Xilosis Lisina Desossicolato agar e Xilosis Lisina Tergitol agar). Le colonie sospette sono state sottoposte a conferma attraverso test biochimici (API 20E – BioMerieux). La tipizzazione sierologica è stata eseguita secondo lo schema di Kauffmann-White.

RISULTATI

Sul totale dei campioni avicoli esaminati, il 9,8 % nel 2008, il 10,9% nel 2009 e il 16,8% nel 2010 è risultato contaminato da *Salmonella* spp.. La percentuale di ceppi isolati da pollo nei tre anni presi in considerazione è la seguente: 19,6% nel 2008 (11,2 % da carne fresca, 8,4% da preparazioni); 22,4% nel 2009 (10,2% da carne fresca, 12,2% da preparazioni); 35,7% nel 2010 (19,1 % da carne fresca, 16,6% da preparazioni).

La percentuale di ceppi isolati da tacchino nei tre anni presi in considerazione è la seguente: 8,3% nel 2008, 10,2% nel 2009, 13,3% nel 2010 (Fig.1).

Nel 2008, *S. Enteritidis* e *S. Coeln* rappresentano i sierotipi più frequentemente isolati dal pollo (20%); *S. Coeln* è risultata la più frequente anche nel 2009 (24,7%); mentre nel 2010 il sierotipo più frequentemente isolato è risultato *S. Muenchen* (26,9%), seguito da *S. Bredeney* (21,1%) che anche nel 2009 era al secondo posto (19,1%) (Fig. 3).

I sierotipi più frequentemente isolati nel tacchino nel 2008 e 2009 sono stati *S. Hadar* (45,4% nel 2008 e 38,5% nel 2009) e *S. Bredeney* (36,4% nel 2008 e 30,7% nel 2009); nel 2010 *S. Saintpaul* (75,0%) (Fig. 2).

DISCUSSIONE

Tra il 2008 e il 2009, la prevalenza di *Salmonella* nelle carni di pollo, nelle preparazioni di carne di pollo e nelle carni di tacchino si è mantenuta pressoché costante. Nel 2010, invece, si rileva un significativo aumento delle positività per tutte queste tipologie di alimenti. Si ritiene che questa differenza tra la prevalenza registrata negli anni 2008-2009 e 2010 sia dovuta al fatto che, per queste tipologie di prodotti, secondo il Reg. CE 2073/2005, *Salmonella* spp. doveva essere ricercata in 10 gr. di alimento fino al 31/12/2009, mentre a partire dal 01/01/2010 si ricerca in 25

gr. di alimento; in questo modo la sensibilità della metodica analitica è più che raddoppiata, aumentando le probabilità di rilevare il batterio.

Nel 2010, rispetto agli anni precedenti, nel pollo è diminuito sensibilmente l'isolamento di *S. Coeln*, *S. Derby*, *S. Livingstone* e *S. Thompson*, mentre è aumentato quello di *S. Bredeney*, *S. Hadar*, *S. Infantis*, *S. Muenchen*. Considerando i sierotipi identificati rilevanti per la sanità pubblica, *S. Enteritidis* è stata rilevata con una frequenza del 20% nel 2008, 0% nel 2009 e 10,9% nel 2010; *S. Typhimurium* è stata rilevata con una frequenza pressoché costante nei tre anni considerati (1,2% nel 2008, 1,1% nel 2009 e 1,3% nel 2010).

Nel 2010 nel tacchino è diminuito l'isolamento di *S. Bredeney* e non è stata isolata nessuna *S. Hadar*, mentre è aumentato sensibilmente l'isolamento di *S. Saintpaul* che è risultato il sierotipo più frequente. Per quanto riguarda i sierotipi identificati rilevanti per la sanità pubblica, *S. Enteritidis* non è mai stata rilevata nei tre anni considerati, mentre *S. Typhimurium* è stata rilevata solamente nel 2009 con una frequenza del 7,7%.

Questo studio conferma l'efficacia dell'applicazione dei piani nazionali di controllo nella riduzione della prevalenza dei sierotipi rilevanti, ma d'altro canto evidenzia un andamento in alcuni casi opposto della prevalenza degli altri sierotipi. Tale considerazione riguarda in generale la situazione europea, e rappresenta un fattore sicuramente rilevante nella definizione

dei nuovi obiettivi di riduzione della prevalenza nel pollame (6). Per quanto riguarda l'impatto dell'applicazione del nuovo criterio microbiologico alle carni fresche di pollame (assenza in 25 grammi), dai nostri dati emerge una notevole variabilità a seconda dei sierotipi che verranno considerati.

BIBLIOGRAFIA

1. Istituto Superiore di Sanità. (2005) Infezioni da Salmonella: diagnostica, epidemiologia e sorveglianza. Rapporti ISTISAN 05/27 – ISSN 1123-3117
2. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. (2009) The EFSA Journal, 223.
3. Direttiva 2003/99/CE del 17 novembre 2003 sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici. G.U.C.E. 12.12.2003, L. 325, 31-37.
4. Regolamento (CE) n. 2160/2003 del 17 novembre 2003 sul controllo della Salmonella e di altri agenti zoonotici specifici presenti negli alimenti. G.U.C.E. 12.12.2003, L. 325, 1-15.
5. Regolamento (CE) n. 2073/2005 del 15 novembre 2005 Sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari. G.U.C.E. 22.12.2005, L. 338, 1-26.
6. Scientific Opinion on a quantitative estimation of the public health impact of setting a new target for the reduction of Salmonella in broilers. EFSA Journal 2011;9(7):2106 [94 pp.]

Figura 1 - Prevalenza di *Salmonella* spp.

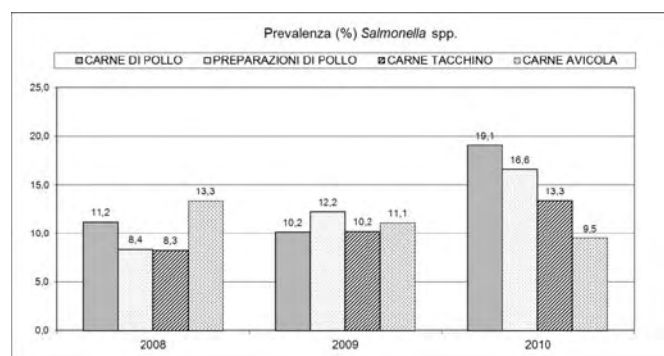


Figura 2 - Sierotipi isolati nelle carni di tacchino

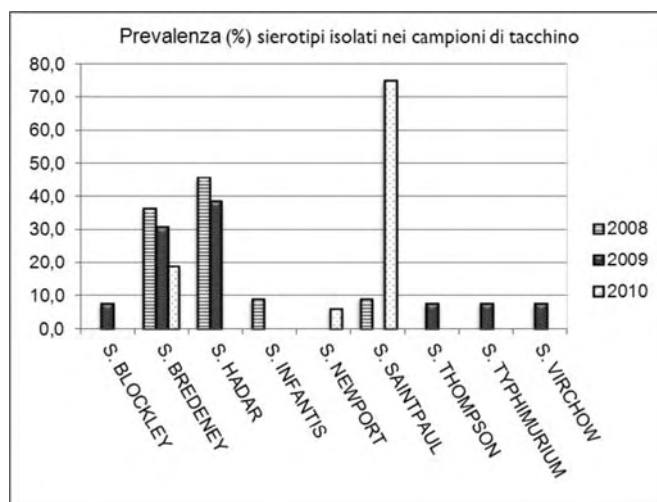
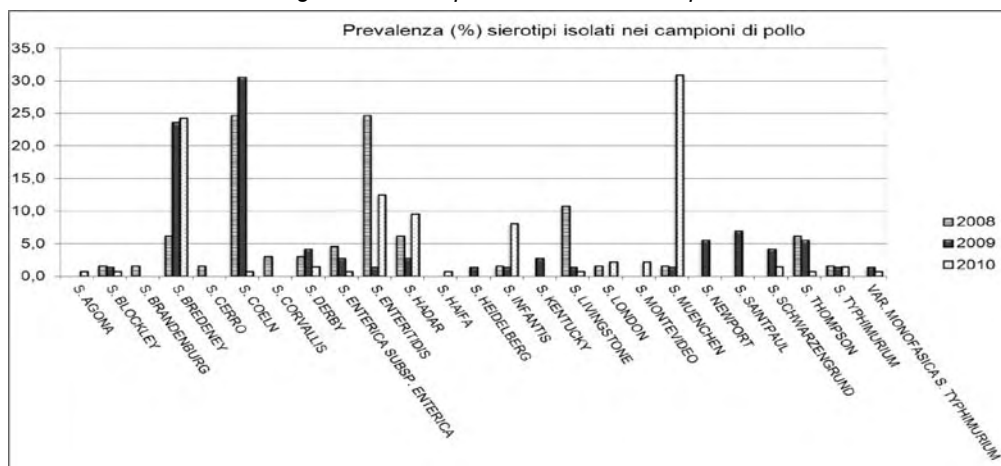


Figura 3 - Sierotipi isolati nelle carni di pollo



VERIFICA DEI CRITERI DI IGIENE IN UN MACELLO DI OVINI E SUINI: STUDIO DEI CEPPI DI *SALMONELLA* spp ISOLATI

Goffredo E.¹, Casoli L.¹, Azzariti L.¹, Castelluccio A.², Carosielli L.², Ramon E.³, Longo A.³, Dalla Pozza M. C.³

Enti: ¹IZS Puglia e Basilicata, ²Azienda sanitaria Locale FG, ³IZS delle Venezie

Key words: Slaughterhouse, carcasses, *Salmonella* spp

INTRODUZIONE

Il Regolamento CE 2073/2005 (1) definisce i criteri di igiene, cui gli OSA, degli impianti di macellazione, devono far riferimento per la valutazione del processo produttivo. Tale valutazione si basa sul campionamento della superficie delle carcasse subito prima della refrigerazione per la valutazione di tre parametri microbiologici: *Salmonella* spp., CBT e Enterobatteriacee. Il veterinario ufficiale, qualora ritenga opportuno verificare il rispetto di tali criteri, può procedere ad ulteriori campionamenti. In tale ottica in un mattatoio privato di medie dimensioni che lavora principalmente suini ed ovini sono stati condotti campionamenti ufficiali da carcasse suine e ovine alla fine delle operazioni di macellazione, subito prima del raffreddamento, secondo le modalità previste dal Reg.(CE) 1441/2007 All.1 cap.3. A seguito di riscontro di *Salmonella* spp. su una carcassa suina, si è deciso di procedere a successivi campionamenti per ottenere dati più attendibili sulla reale situazione igienica del macello, valutando anche l'efficacia delle prescrizioni fatte per migliorare l'igiene del processo produttivo. Dopo il riscontro di *Salmonella* spp. sono stati effettuati anche tamponi da superfici di attrezzature sia della linea suina (vasca di scottatura, depilatrice, spazzolatrice, ganci) che della linea ovina (ganciera mobile, pareti sala iugolazione e sala eviscerazione) al fine di verificare se vi fosse persistenza di *Salmonella* spp. negli ambienti e sulle attrezzature e se questi potessero essere la fonte di contaminazione delle carcasse.

MATERIALI E METODI

Per un periodo di sette settimane, fra settembre e ottobre 2009, con frequenza settimanale, sono state campionate con il criterio della casualità 5 carcasse in una stessa seduta di macellazione, per la specie suina ed ovina. Su ciascuna carcassa venivano effettuati campionamenti da 4 punti di reperi su una superficie di 100 cm² per ciascun punto (ovini: collo - area retronucleare, punta del petto, addome-grassella, torace laterale; suini: collo laterale, torace laterale, addome pancia, gamba laterale), utilizzando il metodo non distruttivo con spugna abrasiva preinumidita, secondo ISO 17604:2003. Le 4 spugne, riposte in un unico contenitore sterile venivano recapitate entro 1 ora dal prelievo, a 4°C, al laboratorio. Il campionamento da superfici ambientali veniva effettuato dopo pulizia, disinfezione ed accurato lavaggio, su un'area di 100 cm², utilizzando delimitatore sterile e spugne preinumidite con BPW. Nella stessa giornata del prelievo ciascun campione da carcassa, è stato sottoposto ad analisi per ricerca di *Salmonella* spp. utilizzando la ISO 6579:2002 e per le Enterobatteriacee (ISO 21528-2:2004). A ciascun campione aggregato venivano aggiunti 400 ml di terreno BPW; dopo stomatizzazione dalla sospensione madre venivano prelevati 2 ml utilizzati per la determinazione della carica di Enterobatteriacee, mentre la restante parte costituiva il prearricchimento per la ricerca di *Salmonella* spp.

La ricerca di *Salmonella* spp. sui tamponi ambientali è stata effettuata, sempre secondo la norma su citata, allestendo per ciascuna spugna un prearricchimento (100ml BPW/spugna). In presenza di colonie sospette di *Salmonella* spp., per ciascuna carcassa, venivano prelevate 5 colonie (o tutte se presenti meno di 5 colonie) sottoposte successivamente ad identificazione biochimica. Gli isolati di *Salmonella* sono stati sierotipizzati secondo lo schema di Kauffman-White tramite agglutinazione a vetrino. Tutti i ceppi isolati sono stati inviati al CRN per le salmonellosi veterinarie-IZS delle Venezie per la tipizzazione fagica, eseguita seguendo lo schema interpretativo dell'International Federation for Enteric Phage Typing (HPA, Colindale, London) sui ceppi di *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*. Tutti gli isolati sono stati poi sottoposti a subtipizzazione molecolare tramite *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) secondo il protocollo PulseNet, previa digestione con XbaI. L'analisi dei cluster è stata eseguita utilizzando il software InfoQuest FP v. 4.5 (Bio-Rad, Hercules, CA).

RISULTATI

10 di 35 carcasse esaminate sono risultate positive per *Salmonella* spp. (28%). Tale risultato ha evidenziato una situazione per il macello al di fuori dai limiti di accettabilità previsti dal Regolamento 2073/2005. Gli isolamenti di *Salmonella* spp. sono stati ottenuti da 5 differenti partite di animali, 4 provenienti da uno stesso centro di raccolta olandese ed 1 direttamente da un allevamento sempre olandese, mentre 2 partite sono risultate negative. La carica di Enterobatteriacee, calcolata sugli stessi campioni ed espressa come valore logaritmico medio giornaliero per cm², è sempre risultata inferiore al valore m ($m = 1,3 \log_{10} \text{ UFC/cm}^2$ media giornaliera, calcolato come indicato nelle Linee Guida Nazionali per l'applicazione del Reg CE 2073/2005 per il metodo non distruttivo). I campionamenti su 35 carcasse di ovini nelle stesse giornate di macellazione hanno portato all'isolamento di *Salmonella* spp. da 2 partite, entrambe provenienti da un centro di raccolta della Romania, mentre altre 4 partite, 1 in importazione dalla Romania e 3 dall'Ungheria sono risultate negative. Complessivamente sono risultate positive 6 carcasse (17%). Anche per le carcasse ovine la carica di Enterobatteriacee è risultata sempre inferiore al valore di m ($0,8 \log_{10} \text{ UFC/cm}^2$ media giornaliera). In seguito ai risultati ottenuti, il veterinario ufficiale è intervenuto con prescrizioni già dopo il 1° campionamento disponendo una revisione del sistema HACCP che ponesse maggior attenzione alla pulizia e alla disinfezione dell'impianto e alla formazione del personale, ma soprattutto prescrivendo la pulizia e la disinfezione dei box delle stalle di sosta prima dell'introduzione di ogni nuova partita di bestiame. Inoltre è stata disposta la sospensione dell'attività dell'impianto nel fine settimana per procedere ad accurata pulizia e disinfezione dello stesso. Successivamente alla disinfezione sono state effettuate tre

serie di tamponi da superfici di aree ed apparecchiature di lavorazione delle linea di macellazione suina ed ovina, risultate sempre negative per *Salmonella* spp.

Lo studio degli isolati (Tab. 1 e 2) ha permesso di identificare fra i 34 ceppi da suini 5 sierotipi: 13 *S. Typhimurium*, 14 *S. Brandenburg*, 4 *S. enterica subsp enterica* 4,9,12:lv:-, 2 *S. Havana*, 1 *S. Anatum*. Nell'ambito dei ceppi di *S. Typhimurium* la fagotipizzazione ha permesso di classificare come appartenenti al fagotipo DT193 9 ceppi mentre, dei restanti 4, 1 apparteneva al fagotipo DT120 e 3 rientravano nel gruppo RDNC (lettura stabile non identificabile). Nell'ambito del fagotipo DT 193 si sono evidenziati 3 pulsotipi; 5 ceppi hanno presentato uno stesso pulsotipo e sono pertanto indistinguibili fra loro. I restanti 4 ceppi sono risultati appartenere a due pulsotipi con coefficiente di DICE del 90%, indice di una stretta correlazione, mentre rispetto ai restanti 5 si è evidenziata una scarsa similarità (coefficiente di DICE = 78%). In effetti questi 4 ceppi sono isolati da 3 carcasse suine macellate nello stesso giorno ed appartenenti ad una stessa partita. Invece dei restanti 5 ceppi di *S. Typhimurium* DT193 e identico pulsotipo, 4 erano stati isolati da 2 carcasse di una stessa partita macellate alla 5 settimana di controlli, mentre un quinto proveniva da una carcassa campionata nella prima settimana. L'analisi molecolare mediante PFGE dei restanti ceppi isolati da suini ha permesso di evidenziare per ciascun sierotipo un unico pulsotipo.

Va sottolineato che per 4 serie di campionamenti risultati positivi si è avuto isolamento di molteplici sierotipi e, per *S. Typhimurium*, di più fagotipi, non solo dalle carcasse macellate lo stesso giorno ed appartenenti ad una stessa partita, ma anche da una stessa carcassa.

Dagli ovini sono stati isolati 13 ceppi di *Salmonella* spp.: 2 da una stessa carcassa sono risultati alla sierotipizzazione *S. Enteritidis* e successivamente identificati come fagotipo DT13A con identico pulsotipo. I restanti 11, isolati da 5 carcasse macellate nella stessa giornata ed appartenenti ad una stessa partita sono risultati essere *S. Typhimurium*, appartenenti 6 al fagotipo DT8 e 5 al fagotipo DT30. Nell'ambito dei due fagotipi, isolati anche da una stessa carcassa, la subtipizzazione molecolare ha evidenziato totale identità dei ceppi (coefficiente DICE 100%).

CONCLUSIONI

La prevalenza di carcasse suine riscontrate positive (28%) è risultata molto più alta di quella attesa se si fa riferimento ai dati ottenuti nel corso del "Monitoraggio sulla prevalenza di *Salmonella* spp. nei suini al macello" (2) condotto nel 2006-2007 nei paesi della CE: i risultati di tale monitoraggio indicano una prevalenza, in base ai dati provenienti da 25 paesi membri del 10,3% su campioni di linfonodi mentre per i campioni da superficie prelevati da 13 paesi, fra cui non sono compresi né Italia né Olanda, la prevalenza è risultata ancora più bassa pari all'8,3%. Questo indica sicuramente l'esistenza di problemi specifici nell'ambito del macello oggetto di indagine. Circa gli isolamenti da carcasse ovine la prevalenza riscontrata è sicuramente inferiore a quella suina, ma comunque non trascurabile (17%). Pur non avendo dati di confronto, carenti sia a livello nazionale che europeo, i nostri risultati, avendo evidenziato sierotipi rilevanti (*S. Typhimurium* ed *Enteritidis*) suggeriscono indagini più approfondite sulla filiera ovina.

Tenuto conto che la carica di *Enterobacteriaceae* è risultata sempre accettabile secondo i criteri stabiliti dal Reg

2073/2005 e che i tamponi ambientali prelevati a più riprese sono risultati sempre negativi, si deve ritenere che la contaminazione delle carcasse non sia ascrivibile a condizioni di igiene carente nel corso del processo di macellazione; si può piuttosto ipotizzare che l'isolamento di *Salmonella* spp. sia da ascrivere ad elevata contaminazione delle partite all'arrivo e/o a persistenza di *Salmonella* spp. nelle stalle di sosta, dove per altro si rispetta il criterio tutto vuoto- tutto pieno e dove, nel corso dell'indagine in base alle prescrizioni del veterinario ufficiale, si è posta maggiore attenzione alla disinfezione prima di ogni nuovo ingresso, senza notare miglioramenti. In effetti è noto (3) come le caratteristiche strutturali, soprattutto dei pavimenti delle stalle di sosta e degli ambienti dove gli animali sostano prima della macellazione possano influenzare l'efficacia dei processi di sanificazione. L'isolamento di uno stesso fagotipo e pulsotipo di *S. Typhimurium* all'inizio dell'indagine e poi in numero più numeroso nell'ultima partita suina risultata positiva, con un'intervallo di tempo fra i due campionamenti di circa un mese, parrebbe avvalorare l'ipotesi di una contaminazione persistente in tali ambienti. D'altro canto, tenuto presente che gli animali provenivano da uno stesso centro di raccolta, e forse da stessi allevamenti si può anche supporre che gli animali fossero stati esposti alla stessa fonte di contaminazione prima dell'arrivo al macello. Relativamente alle caratteristiche dei ceppi, i sierotipi dai noi isolati da suini sono quelli per i quali è segnalata una maggior circolazione nella stessa specie, sia in base al Monitoraggio condotto nella CE, sia dai dati nazionali derivanti dall'ultimo Report 2009 ENTER-VET (4). Relativamente ai fagotipi di *S. Typhimurium*, il fagotipo DT193 è fra quelli più frequentemente isolato fra i suini, mentre il DT120 è segnalato presente a partire dal 2009.

Circa gli isolamenti da carcasse ovine, i ceppi di *S. Typhimurium*, talvolta isolati anche da una stessa carcassa, sono risultati appartenere a più fagotipi, diversi da quelli isolati dai suini e non segnalati circolanti in Italia negli ultimi tre anni in base al Report ENTER-VET 2009 (4). Tali riscontri ci permettono da una parte di escludere una cross-contaminazione fra linea ovina e suina nell'ambito del macello, ancora a conferma di una buona conduzione dell'impianto stesso, dall'altra ci inducono a pensare che le partite di ovini fossero contaminate all'origine. A supporto di tale ipotesi vi è anche il mancato isolamento di salmonelle dalla partita 3, campionata sia al 3° che al 4° controllo e quindi rimasta nelle stalle di sosta per oltre una settimana.

SUMMARY

Environmental samples and swabs, from pork and lamb carcasses were collected as defined by Regulation 2073/2005 in a slaughterhouse, by the official veterinarian. These controls were aimed to verify the hygienic conditions of the manufacturing process. The samples collected were analyzed for *Salmonella* spp. and *Enterobacteriaceae*. The count of *Enterobacteriaceae* was always below the limits of acceptability. Indeed, *Salmonella* was isolated from 28% of pig carcasses and from 17% of sheep carcasses. Environmental samples resulted always negative. *Salmonella* strains isolated were subjected to serotyping, phage-typing and molecular sub-typing by PFGE. Based on our data, it could be attributed the presence of *Salmonella* spp. to the poor health status of animals or to the persistence of *Salmonella* in leirage.

Tabella 1 SUINI			
Serie	Carcassa	N. ceppi	Sierotipi e fagotipi
1	1	3	<i>S. ent. subsp.ent. (9,12: l,v:-)</i> <i>S. Typhimurium DT193</i> <i>S. Anatum</i>
2	1	3	<i>S. ent subsp.ent. (9,12: l,v:-)</i>
	2	2	<i>S. Typhimurium DT193</i>
	4	5	<i>S. Typhimurium DT193</i> <i>S. Typhimurium RDNC</i> <i>S. Havana</i>
	5	3	<i>S. Typhimurium DT193</i> <i>S. Typhimurium DT120</i> <i>S. Typhimurium RDNC</i>
3	1	4	<i>S. Brandenburg</i>
4	4	5	<i>S. Brandenburg</i>
	5	4	<i>S. Brandenburg</i>
5	2	3	<i>S. Typhimurium DT193</i>
	3	2	<i>S. Typhimurium DT193</i> <i>S. Brandenburg</i>

Tabella 2 OVINI			
Serie	Carcassa	N. ceppi	Sierotipi e fagotipi
2	1	2	<i>S. Enteritidis PT13A</i>
5	1	2	<i>S. Typhimurium DT8</i>
	2	2	<i>S. Typhimurium DT8</i>
	3	4	<i>S. Typhimurium DT8</i> <i>S. Typhimurium DT30</i>
	4	2	<i>S. Typhimurium DT30</i>
	5	1	<i>S. Typhimurium DT30</i>

1. Anon 2005 Regolamento della Commissione (CE) del 15 novembre 2005 (2073/2005) GU Unione Europea L338, 1-26
2. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, Part A, *The EFSA Journal* (2008) 135,1-111
3. De Busser E.V., Maes D., Houf K., Dewulf J., Imberichts H., Bertrand S., DeZutter L. (2011) "Detection and characterization of *Salmonella* in lairage, on pig carcasses and intestines of five slaughterhouses" *Int.J.Food Microbiol.* 145,279-286
4. Anon. "ENTER-VET Report 2009" IZS delle Venezie Centro di Referenza nazionale per le Salmonellosi

CARATTERIZZAZIONE DI ISOLATI DI *SALMONELLA* ENTERICA 4,[5],12:i:- DT193 ASSOCIATI A DUE DISTINTI EPISODI DI SALMONELLOSI

Barco L.¹, Ramon E.¹, Dalla Pozza M. C.¹, Longo A.¹, Lettini A.¹, Minorello C.¹, Saccardin C.¹, Dionisi Am.², Ricci A.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi, Legnaro (PD)

²Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Malattie Infettive, parassitarie e immunomediate, Roma

Keywords: *Salmonella* 4,[5],12:i:-, PFGE

INTRODUZIONE

Salmonella enterica 4,[5],12:i:- viene considerata come variante monofasica di *S. Typhimurium* e rappresenta un sierotipo emergente per i numerosi episodi di tossinfezione ad esso associati. Dal punto di vista fenotipico il profilo di antibiotico resistenza più diffuso per questo sierotipo è rappresentato da Ampicillina, Streptomina, Sulfonamidi e Tetraciclina (ASSuT) (1). Per quanto concerne invece la fagotipizzazione, eseguita impiegando lo schema specifico per *S. Typhimurium*, sono stati descritti differenti fagotipi tra i quali, negli ultimi anni, si è verificato un incremento degli isolati appartenenti al fagotipo DT193 (2). L'interesse verso ceppi con queste caratteristiche si è ulteriormente acuito quando nel 2006 è stato descritto in Lussemburgo un focolaio di salmonellosi causato da *S. 4,[5],12:i:-* che ha determinato la morte di una persona ed è stato associato al consumo di carne suina. Nello specifico, il ceppo responsabile di questo episodio è stato descritto come DT193, tetraresistente (ASSuT) con profilo di PFGE STYMXB.0131 (3). Indagini successive hanno permesso di ipotizzare che tale linea clonale si stia progressivamente diffondendo in Europa (4). L'obiettivo del presente studio è: 1) descrivere ceppi con caratteristiche analoghe, isolati in Italia, associati a due distinti episodi di salmonellosi nell'uomo e 2) descrivere l'approccio molecolare utilizzato per caratterizzare e distinguere gli isolati riconducibili ai due episodi.

MATERIALI E METODI

I 27 ceppi di *Salmonella* 4,[5],12:i:- studiati sono stati isolati nell'ambito di due episodi di salmonellosi, verificatisi rispettivamente nel 2009 e nel 2010 in due differenti regioni del Nord Italia. Nell'ambito dell'episodio A, *S. 4,[5],12:i:-* DT193 ASSuT è stata isolata da un gatto e da due proprietari dell'animale (un adulto e un bambino). L'episodio B invece ha interessato un esercizio di ristorazione collettiva, presso il quale venivano allevati polli e suini destinati alla produzione di parte degli alimenti somministrati nell'esercizio stesso. In questo caso, *S. 4,[5],12:i:-* DT193 ASSuT è stata isolata dai polli e suini allevati nella struttura, da differenti tipologie di salumi e insaccati, freschi e stagionati, ottenuti con le carni dei suini allevati presso la struttura, e dai clienti del ristorante che hanno manifestato salmonellosi. L'isolamento di *Salmonella* è stato eseguito utilizzando la ISO 6579:2002 –Cor1:2004 e l'AnnexD/ISO 6579:2007. Gli isolati di *Salmonella* sono stati sierotipizzati secondo lo schema di Kauffman-White tramite agglutinazione a vetrino, quindi la conferma dell'assenza del gene *fliB*, caratteristica degli ceppi di *Salmonella* monofasici, è stata realizzata attraverso un saggio in PCR (5). La tipizzazione fagica è stata eseguita seguendo lo schema interpretativo dell'International Federation for Enteric Phage Typing (HPA, Colindale, London). Quindi, è stato determinato il profilo di antibiotico-resistenza secondo il metodo Kirby-Bauer testando le seguenti molecole: colistina, sulfametossazolo + trimetoprim, kanamicina, gentamicina, ceftazidime, cefotaxime, amoxicillina + acido clavulanico, acido nalidixico, tetraciclina, ampicillina, streptomina, sulfonamidi,

cloramfenicolo, cefalotina, enrofloxacin e ciprofloxacina. I ceppi sono stati subtipizzati attraverso Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) impiegando tre differenti enzimi di restrizione (*Xba*I, *Spe*I e *Bln*I) in accordo con il protocollo PulseNet. L'analisi dei cluster è stata eseguita utilizzando il software InfoQuest FP v. 4.5 (Bio-Rad, Hercules, CA). Quindi, il coefficiente di Dice è stato utilizzato per calcolare i valori di similarità e l'algoritmo UPMGA (unweighted pair group method with arithmetic means), con 2.00% di tolleranza e 1.00% di ottimizzazione, per ottenere il dendrogramma. I profili di PFGE che differivano per almeno una banda sono stati considerati come distinti. Infine, i profili ottenuti utilizzando *Xba*I sono stati confrontati con quelli del database internazionale gestito dalla Health Protection Agency (HPA) in modo tale da riuscire ad attribuire il nome del pulsotipo in accordo con la nomenclatura definita dal sistema PulseNet Europa.

RISULTATI

Tutti gli isolati ottenuti nell'ambito dei due episodi (27) sono stati confermati come *S. 4,[5],12:i:-*, appartenenti al fagotipo DT193 e con profilo di resistenza ASSuT. La PFGE, eseguita con enzima *Xba*I, ha permesso di classificare gli isolati in due differenti pulsotipi: STYMXB.0131, che rappresentava quello dominante, e un secondo pulsotipo, classificato come STYMXB.0131a, dal momento che non corrispondeva a nessun profilo codificato dal sistema PulseNet, e che differiva dal precedente per una sola banda. A quest'ultimo pulsotipo appartenevano 4 ceppi isolati nell'ambito dell'episodio B, rispettivamente da 3 campioni di feci suine e 1 campione di salume. Al pulsotipo STYMXB.0131 invece appartenevano i 4 ceppi isolati nell'ambito dell'episodio A e i rimanenti 19 ceppi isolati nell'ambito dell'episodio B (1 ceppo da feci di pollo, 7 da feci di suino, 7 da insaccati e salumi, 4 da clienti del ristorante). In definitiva, 23 ceppi isolati dai due episodi di salmonellosi, non correlati epidemiologicamente, risultavano indistinguibili dal punto di vista fenotipico e genotipico. Si è quindi proseguita l'analisi di subtipizzazione molecolare dei 23 ceppi appartenenti al pulsotipo STYMXB.0131 con PFGE impiegando gli enzimi di restrizione *Spe*I e *Bln*I per discriminare gli isolati riconducibili ai due episodi. Utilizzando l'enzima *Spe*I tutti i ceppi testati si sono riconfermati indistinguibili. L'analisi eseguita con *Bln*I invece ha permesso di differenziare gli isolati riconducibili ai due episodi (Fig.1). Con tale enzima complessivamente sono stati ottenuti 3 differenti profili. Il profilo 1 comprendeva 3 ceppi riconducibili all'episodio B (1 ceppo isolato da feci di pollo, 1 ceppo isolato da salume e 1 ceppo umano), al profilo 2 appartenevano 16 ceppi tutti riconducibili all'episodio B (7 ceppi isolati da feci suine, 6 ceppi isolati da salumi e insaccati e 3 ceppi umani), mentre al profilo 3 appartenevano i 4 ceppi isolati nell'ambito dell'episodio A. Il coefficiente di similarità tra i profili 1 e 2 è risultato pari a 96%, mentre tra i primi due profili e il terzo il coefficiente è risultato pari a 91%.

DISCUSSIONE

Salmonella 4,[5],12:i:- viene descritta come un sierotipo emergente con diffusione su scala mondiale. Studi recenti

hanno dimostrato che tale sierotipo rappresenta un rischio per la salute pubblica, del tutto paragonabile a *S. Typhimurium* e direttamente correlato al consumo di alimenti a base di carne suina (4). Tra i cloni emergenti descritti per questo sierotipo vi è il DT193, ASSuT, STYMXB.0131, che è stato collegato prevalentemente alla filiera suina (1,4). I due episodi di salmonellosi descritti nel presente lavoro dimostrano che anche nel nostro Paese si sono rapidamente diffusi ceppi che presentano queste caratteristiche fenotipiche e genotipiche e sono caratterizzati da rilevante patogenicità. Questa indagine ha permesso di confermare che, a differenza di quanto descritto fino a questo momento, tale clone non sia specifico della filiera suina e che la trasmissione all'uomo non avvenga esclusivamente attraverso il consumo di alimenti contaminati, ma, al contrario, sembra interessare anche animali d'affezione e la trasmissione all'uomo si può verificare anche per contatto diretto con gli animali infetti. La PFGE viene riconosciuta come "gold standard" per la subtipizzazione di differenti batteri patogeni tra cui salmonella. Tuttavia è stato dimostrato che, per alcuni sierotipi molto clonali (come *S. Enteritidis*), la PFGE eseguita utilizzando un singolo enzima di restrizione presenta un potere discriminante molto limitato. Lo studio condotto ha permesso di evidenziare che sebbene *S. 4,[5],12:i:-* sia stato descritto come un sierotipo piuttosto eterogeneo, sembra presentare ceppi particolarmente clonali, caratterizzati da ampia diffusibilità. Sulla base dei risultati qui presentati, la PFGE condotta esclusivamente con *XbaI* non ha permesso di differenziare ceppi epidemiologicamente distinti. L'impiego combinato di *XbaI* e *BlnI* invece ha determinato un aumento del potere discriminante della metodica, tale da permettere la differenziazione dei ceppi isolati nell'ambito dei due episodi. Infatti i dati riportati dimostrano che, nell'ambito di studi epidemiologici mirati alla valutazione della correlazione tra ceppi, è auspicabile non limitare l'analisi di PFGE ad un singolo enzima di restrizione, ma aumentare il potere discriminante della metodica impiegando un secondo enzima.

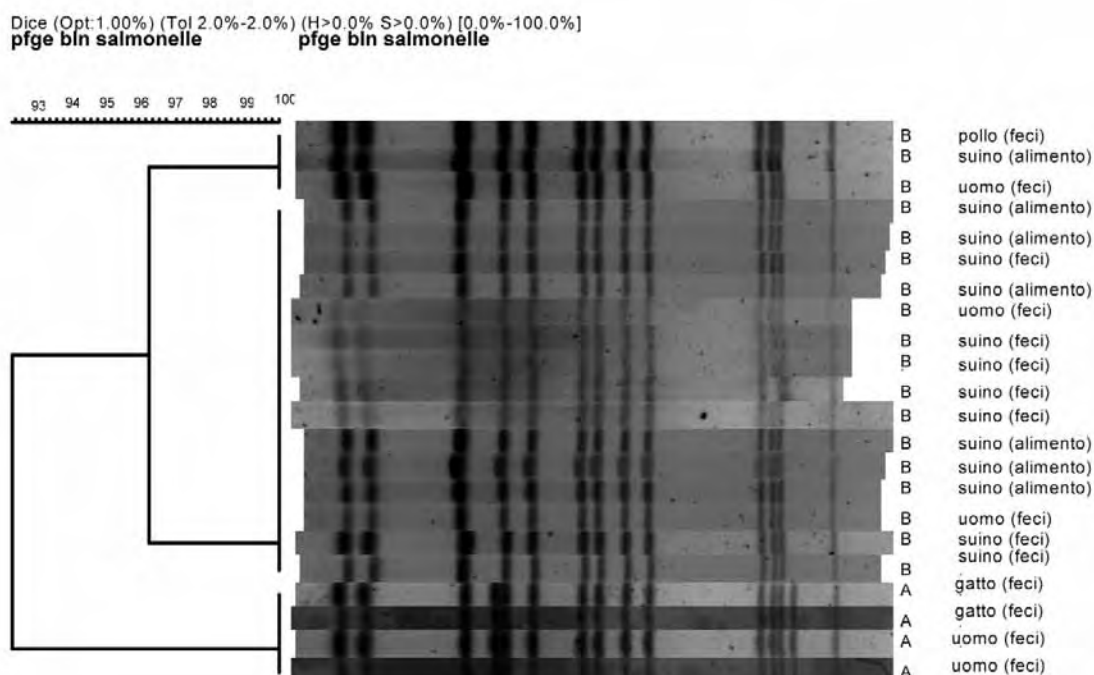
SUMMARY

Salmonella 1,4,[5],12:i:- is a monophasic variant of *S. Typhimurium*, and is considered an emerging epidemic serovar. A clonal lineage of this serovar (characterized by phage-type: DT193, antimicrobial resistance profile: ASSuT, PFGE profile: STYMXB.0131) is currently spreading within Europe and was responsible of a very severe outbreak in Luxembourg in 2006. The aims of the present paper were: 1) to describe strains of this clonal lineage isolated in Italy during two distinct *Salmonella* outbreaks and, 2) to present the molecular approach used to characterize and distinguish strains attributable to the two outbreaks.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Hopkins KL, Kirchner M, Guerra B, Granier SA, Lucarelli C, Porrero MC, Jakubczak A, Threlfall EJ, Mevius DJ. Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Europe: a new pandemic strain?. *Euro Surveill.* 2010;15(22):pii=19580
Trupschuch S., Laverde Gomez J.A., Ediberidze I., Flieger A., Rabsch W. Characterization of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium 4,[5],12:i:- DT193 strains carrying a novel genomic island adjacent to the *thrW* tRNA locus. *Int J Med Microbiol* 2010; 30:279-288
- 2) Mossong J, Marques P, Ragimbeau C, Huberty-Krau P, Losch S, Meyer G, Moris G, Strottner C, Rabsch W, Schneider F. Outbreaks of monophasic *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Luxembourg, 2006. *Euro Surveill.* 2007;12(6):pii=719
Hauser E., Tietze E., Helmuth R., Junker E., Blank K., Prager R., Rabsch W., Appel B., Fruth A., Malorny B. Pork contaminated with *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:-, an emerging health risk for humans. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76:4601-4610
Barco L., Lettini AA., Ramon E., Longo A., Saccardin C., Dalla Pozza MC., Ricci A. A rapid and sensitive method to identify and differentiate *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:- by combining traditional serotyping and multiplex polymerase chain. *Foodborne Pathog Dis* 2011; 8:741-743

Figura 1 Dendrogramma relativo alla selezione di ceppi *S. 4,[5],12:i:-* DT193 ASSuT STYMXB.0131 isolati nell'ambito dei due episodi di salmonellosi, generato dall'analisi PFGE eseguita con *BlnI*



RICERCA DI *Escherichia coli* PRODUTTORI DI VEROCITOTOSSINA IN SEMI DESTINATI ALLA PRODUZIONE DI GERMOGLI: PROBLEMATICHE ED ESPERIENZE DI LABORATORIO

Tozzoli R., Morabito S., Scavia G., Ferreri C., Grande L., Michelacci V., Minelli F., Marziano M. L., Caprioli A.

Laboratorio Europeo e Nazionale di Riferimento per *Escherichia coli*, Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Roma

Keywords: *Escherichia coli*, semi, VTEC O104:H4

ABSTRACT

Sprouts have been implicated as the source of the outbreak of Verocytotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC) O104:H4 infections occurred in Europe in May-June 2011. Despite the strong epidemiological evidences on their role, the outbreak strain has never been isolated from either sprouts or seeds used for their production. This has stressed the need for laboratory testing of seeds, which have recognized as the source of sprout contamination in most of the epidemic episodes described in literature.

INTRODUZIONE

Dall'inizio di Maggio 2011 si è verificata in Germania un'epidemia di colite emorragica e sindrome emolitico uremica (SEU) causata da un sierotipo di *Escherichia coli* produttore di verocitotossina (VTEC) piuttosto raro, *E. coli* O104:H4. L'epidemia è stata molto vasta: alla fine di Luglio l' European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC) riportava un totale di 4033 casi, 50 decessi e 901 casi di SEU (1).

Le indagini epidemiologiche hanno portato ad identificare nel consumo di germogli vegetali crudi contaminati la probabile origine del focolaio epidemico. I germogli di specie vegetali diverse destinati al consumo senza previa cottura sono stati spesso identificati quale sorgente di infezione da Salmonella e da VTEC (3). La maggior parte degli episodi riportati in letteratura era associato all'utilizzo di semi potenzialmente contaminati durante le pratiche agricole di coltivazione, fertilizzazione, raccolta e stoccaggio. La contaminazione può tuttavia avvenire durante la preparazione dei germogli, mediante l'utilizzo di acqua contaminata o a causa dell'adozione di pratiche igieniche scorrette da parte degli operatori.

Nel mese di giugno in Francia si è verificato un secondo focolaio di infezione associato al ceppo VTEC O104:H4 con caratteristiche simili al ceppo epidemico tedesco che ha visto coinvolti 16 pazienti, di cui otto con SEU. Anche questo episodio era riconducibile al consumo di germogli crudi e ha pertanto rafforzato l'ipotesi che entrambi i focolai fossero originati da germogli prodotti da semi contaminati, in particolare dallo stesso lotto di semi di fieno greco utilizzati in entrambi gli episodi.

L'identificazione dei semi quale veicolo di infezione ha portato alla diffusione di allerte RASFF che hanno coinvolto numerosi Stati Membri dell'Unione Europea. I Laboratori Nazionali di Riferimento (LNR) di tali stati sono stati chiamati ad effettuare analisi di laboratorio su questa matrice e DG SANCO ha chiesto al nostro laboratorio, quale Laboratorio Europeo di Riferimento per *Escherichia coli* (EU-RL VTEC), di offrire assistenza tecnica ai laboratori europei coinvolti nell'analisi dei campioni di semi.

L'EU-RL ha quindi incluso un annesso specifico per la ricerca di VTEC nella matrice "semi" alla procedura già messa a punto per effettuare la ricerca di VTEC O104 negli alimenti. Tale procedura, basata sullo screening di colture di arricchimento per la presenza dei geni codificanti le VT e l'antigene di superficie

O104 mediante Real Time PCR era stata resa disponibile alla rete dei laboratori nazionali di riferimento già il 2 Giugno mediante pubblicazione sul sito web dell'EU-RL VTEC (2).

Nel corso di indagini svolte presso il nostro laboratorio su lotti di semi ritirati in Italia, abbiamo identificato in alcuni campioni la presenza di ceppi VTEC. I ceppi, diversi dal ceppo epidemico tedesco sono stati isolati e caratterizzati. Questi campioni sono stati quindi utilizzati per organizzare uno studio interlaboratorio per i LNR degli stati membri maggiormente coinvolti nelle analisi di laboratorio successive ai RASFF. Gli obiettivi di tale studio erano:

1. armonizzare le procedure di laboratorio
2. contribuire alla comprensione della natura della contaminazione da VTEC nella matrice semi.

Lo scopo di questa comunicazione è di presentare i risultati dello studio inter-laboratorio condotto su campioni di semi e discutere le problematiche relative all'esame di questa particolare matrice.

DISEGNO DELLO STUDIO

Nel corso delle analisi di laboratorio condotte su lotti di semi potenzialmente coinvolti nell'epidemia da *E. coli* O104:H4, il nostro laboratorio ha analizzato nel Giugno 2011 dieci lotti di semi di bietola. I test sono stati eseguiti su 50 grammi di semi, arricchiti in 450 ml di Acqua Peptonata Tamponata come riportato nella procedura pubblicata sul sito dell'EU-RL (2). Tre campioni sono risultati positivi alla PCR Real Time per i geni *vtx2* ed *e-hly*, mentre erano negativi per i geni *eae* e *vtx1*. Da due dei tre campioni positivi sono stati isolati ceppi VTEC con lo stesso profilo di geni di virulenza (*vtx2* ed *e-hly*), che agglutinavano con un antisiero anti-O74, successivamente inviati al WHO Reference Centre di Copenhagen per la conferma del sierogruppo.

Uno dei due campioni da cui era stato isolato il ceppo VTEC e due dei sette campioni negativi sono stati selezionati per lo studio interlaboratorio. Abbiamo prelevato 50 gr dei campioni ed eseguito nuovamente le analisi di Real Time PCR, che hanno confermato i risultati ottenuti in precedenza.

All'inizio di Luglio i tre campioni sono stati inviati ai laboratori partecipanti, ai quali era richiesto di ricercare i geni *vtx* nei brodi di arricchimento e di isolare il ceppo VTEC in caso di positività. Il saggio per la determinazione dei geni *eae* ed *e-hly* era facoltativo. I partecipanti potevano utilizzare i metodi già in uso nei rispettivi laboratori oppure il metodo fornito dall'EU-RL VTEC.

Tabella 1. Risultati attesi dello screening in Real Time PCR sui campioni di semi inviati per lo studio inter-laboratorio

Campione A	Campione B	Campione C
<i>vtx2+</i> ; <i>vtx1-</i> ; <i>ehly+</i> , <i>eae-</i>	negativo	negativo

LABORATORI PARTECIPANTI ALLO STUDIO

I laboratori che hanno preso parte allo studio erano:

- LNR degli Stati Membri coinvolti nei RASFF sui semi (Germania, Francia, Italia, Olanda e Regno Unito)
- Laboratori particolarmente impegnati nella discussione internazionale sull'analisi dei semi (LNR del Belgio e Danimarca, e ANSES, FR).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Tutti i partecipanti allo studio interlaboratorio hanno utilizzato il metodo fornito dall'EU-RL VTEC. I risultati dello screening in Real Time PCR sono riportati nella Tabella 2. Come si può osservare, due laboratori hanno ottenuto risultato positivo per la presenza del gene *eae* in un unico campione da cui hanno potuto anche isolare il ceppo di *E. coli* responsabile per tale positività. Un laboratorio ha riscontrato la presenza del gene *vtx2* nel campione B da cui però non è stato possibile isolare il ceppo batterico.

Tabella 2. Risultati dello screening in Real Time PCR riportati dai laboratori partecipanti studio inter-laboratorio

Campione (risultati attesi)	N. di risultati positivi/N. di analisi			
	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>e-hly</i>
A (<i>vtx2+</i> , <i>e-hly+</i>)	0/8	0/8	2/6	0/4
B (negativo)	0/8	1/8	0/6	0/4
C (negativo)	0/8	0/8	0/6	0/4

Tutti i laboratori che hanno partecipato allo studio hanno quindi riportato risultati differenti da quelli attesi in base alle prime analisi effettuate presso l'EU-RL VTEC.

Questa mancata corrispondenza tra i risultati ottenuti e quelli attesi non è da considerare del tutto sorprendente. Infatti, i campioni di semi sono composti da particelle che potrebbero essere contaminate singolarmente e distribuite in maniera non omogenea all'interno dei lotti. Inoltre, sulla base dei pochi dati presenti in letteratura, la contaminazione dei semi da parte di germi patogeni spesso avviene a livelli molto bassi.

I risultati ottenuti nell'ambito dello studio interlaboratorio potrebbero riflettere un basso livello di contaminazione non omogenea dei lotti di semi da cui sono stati prelevati i campioni. Questa ipotesi è supportata dai risultati di ulteriori indagini effettuate sui lotti di semi presso il nostro laboratorio. Tre porzioni di 50 gr ognuna appartenenti ai lotti usati nello studio sono state saggiate in tre differenti date: due precedenti la spedizione dei campioni e una durante lo svolgimento del test interlaboratorio. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 3.

Tabella 3. Risultati dello screening in Real Time PCR ottenuti presso l'EU-RL VTEC in diverse date sui campioni selezionati per lo studio inter-laboratorio

Campione	Risultati della Real Time PCR (Ct)		
	1° test - 12 Giugno 2011	2° test - 5 Luglio 2011	3° test - 14 Luglio 2011
A	<i>vtx1- vtx2+</i> (Ct=20), <i>eae-</i> , <i>e-hly+</i> (Ct=20)	<i>vtx1- vtx2+</i> (Ct=31), <i>eae-</i> , <i>e-hly+</i> (Ct=31)	<i>vtx1- vtx2-</i> , <i>eae-</i> , <i>e-hly-</i>
B	<i>vtx1- vtx2-</i> , <i>eae-</i> , <i>e-hly-</i>	<i>vtx1- vtx2-</i> , <i>eae-</i> , <i>e-hly-</i>	<i>vtx1- vtx2+</i> (Ct=37), <i>eae-</i> , <i>e-hly-</i>
C	<i>vtx1- vtx2-</i> , <i>eae-</i> , <i>e-hly-</i>	<i>vtx1- vtx2-</i> , <i>eae-</i> , <i>e-hly-</i>	<i>vtx1- vtx2-</i> , <i>eae-</i> , <i>e-hly-</i>

Nel nostro laboratorio abbiamo condotto ulteriori analisi sull'altro lotto di semi positivo per VTEC nella prima analisi effettuata e da cui avevamo isolato il ceppo di *E. coli vtx2+*. Ulteriori otto porzioni da 50 gr sono state saggiate per la presenza del gene *vtx2* mediante Real Time PCR il 14 Luglio. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 4, a confronto con quelli ottenuti nella prima analisi condotta il 12 Giugno.

Tabella 4. Risultati dello screening in Real Time PCR ottenuti presso l'EU-RL VTEC su diverse porzioni di campioni di semi

Data dell'analisi	Risultati della Real Time PCR per l'identificazione del gene <i>vtx2</i> (Ct) per ogni porzione								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
12 Giugno 2011	+ (Ct=23)								
14 Luglio 2011		+ (Ct=36)	-	-	+ (Ct=37)	-	-	-	-

Questi dati avvalorano l'ipotesi che i risultati riportati nel corso dello studio inter-laboratorio siano dovuti a un livello molto basso e disomogeneo di contaminazione dei semi. Non si può escludere che con il passare dei giorni il livello di contaminazione dei campioni possa essere ulteriormente diminuito. Tuttavia, i dati ad oggi disponibili sembrano mostrare che la contaminazione dei semi da patogeni enterici potrebbe persistere per periodi anche più lunghi rispetto al tempo impiegato per l'organizzazione e lo svolgimento dello studio inter-laboratorio (4).

CONCLUSIONI

In generale i risultati ottenuti suggeriscono che:

- il metodo originato tramite una discussione approfondita tra diversi laboratori durante la crisi e messo a punto dall'EU-RL VTEC rappresenta uno strumento utile per l'identificazione dei VTEC in campioni di semi avendo, portato all'isolamento del ceppo VTEC in almeno due campioni di semi contaminati naturalmente;
- un risultato negativo non definisce con certezza l'assenza del patogeno in un determinato lotto di semi dal momento che la contaminazione sembrerebbe essere un evento sporadico e non omogeneamente distribuita all'interno del lotto.

Il punto chiave per l'identificazione di VTEC in campioni di semi sembra essere rappresentato dalla strategia di campionamento. L'approccio basato sul test di una singola porzione di semi sembra non essere sufficiente nell'identificare un lotto positivo, mentre una strategia di campionamento che preveda l'analisi di più unità campionarie potrebbe risultare più efficace.

RIFERIMENTI

1. European Centre for Disease Prevention and Control http://ecdc.europa.eu/en/activities/sciadvce/Pages/Epidemiological_Updates.aspx
2. European Reference Laboratory for *E. coli* <http://www.iss.it/vtec/work/cont.php?id=152&lang=2&tipo=3>
3. Registro Italiano della Sindrome Emolitico Uremica. <http://www.iss.it/seu>
4. US Food and Drug Administration www.fda.gov/food/foodsafety/productspecificinformation/fruitsvegetablesjuices/ucm078789.htm

INDAGINE EPIDEMIOLOGICA SULLA PRESENZA DI *Campylobacter jejuni* NEL LATTE DI MASSA DELLE AZIENDE BOVINE DELLA PROVINCIA DI LODI

Santoro E.¹, Benedetti V.^{1,2}, Invernizzi E.², Miccolupo A.³, Nassuato C.⁴, Parisi A.³, Vezzoli F.¹, Luini M.¹

¹IZSLER – Sezione di Lodi, ²ASL della Provincia di Lodi, ³IZS Puglia e Basilicata - Sezione di Putignano (BA), ⁴IZSLER – S.E.L.

KEY WORDS: *Campylobacter jejuni*, milk, bovine

SUMMARY

Campylobacter jejuni is the most common cause of foodborne infection in Europe. The aim of this study was to evaluate the prevalence of *Campylobacter* spp. in the bulk tank milk from dairies of an area of the Po Valley and to study the genetic variability among isolates. In total 31 strains of *C. jejuni* were isolated from the 258 examined samples (12%). Our results suggest that the contamination sources may be either feces or udder infection. The isolates were classified by MLST into 13 different Sequence Types, mainly belonging to the Clonal Complex-21 (9 strains), followed by CC-48 (3 strains), CC-61, CC-206 and CC-403 (2 strains).

INTRODUZIONE

Secondo i dati dell'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA), le infezioni umane da *Campylobacter* spp. presentano la maggiore incidenza nell'Unione Europea tra le infezioni batteriche a veicolo alimentare con una stima di nove milioni di casi all'anno (2). Il consumo di carne non adeguatamente cotta, in particolar modo quella di pollame, rappresenta nel 20-30% dei casi la fonte di contaminazione (3,6). Tra gli altri alimenti di origine animale, il latte bovino è ritenuto una potenziale fonte di contagio per l'uomo. La contaminazione del latte da *C. jejuni* può verificarsi durante la mungitura da parte di stipiti che colonizzano il tratto gastrointestinale di questi animali, o in alternativa essere la conseguenza di una localizzazione a livello mammario di questi microrganismi che genera una contaminazione elevata e persistente del latte delle singole bovine (9). Fra i metodi di caratterizzazione molecolare di *Campylobacter*, MLST (Multi-Locus Sequence Typing) è una tecnica discriminante e riproducibile utilizzata internazionalmente per gli studi di epidemiologia molecolare (7). Essa in funzione delle sequenze di sette diversi geni cataloga gli isolati in Sequence Types (ST). A loro volta ST geneticamente affini sono riuniti in gruppi denominati Complessi Clonali (CC). In generale, i principali CC isolati dal bovino sono CC-61, CC-48, CC-42, mentre CC-21 mostra una più ampia distribuzione tra le diverse specie animali, probabilmente per una spiccata capacità di adattamento di questo particolare genotipo. L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di studiare la prevalenza della contaminazione da *Campylobacter* spp. del latte di massa in alcune aziende di bovine da latte della provincia di Lodi ed effettuare la genotipizzazione dei ceppi isolati per considerazioni di tipo epidemiologico.

MATERIALI E METODI

Campioni - Sono stati analizzati campioni di latte di massa provenienti da 258 delle 351 aziende da latte della provincia di Lodi. Il prelievo è stato effettuato in contenitori sterili dopo agitazione e raffreddamento della massa a fine mungitura ed è stato conservato refrigerato a 4-7° C fino alla consegna al laboratorio. In alcune aziende, dopo 30-90 gg è stato effettuato un secondo campionamento del latte di massa ed un campione di feci ambientali (pool di 15 campioni raccolti da terra nei punti di maggiore passaggio).

Esami batteriologici - *Isolamento di Campylobacter* - I campioni di latte e di feci sono stati inoculati nella quantità di 25 g secondo una diluizione 1:10 in terreno liquido di Bolton. Dopo incubazione per 48 ore a 43 C°, 100 µl di brodo sono stati piastrati su mCCD agar

e Skirrow agar in seguito a filtrazione attraverso una membrana di 0.45 µm ed incubati in microaerofilia (GENbag microaer. Biomerieux) per altre 48 h. Le colonie morfologicamente riferibili a *Campylobacter* spp. sono state sottoposte a colorazione di Gram e identificate tramite PCR specifica come di seguito descritto. **Multiplex PCR** - Il DNA è stato estratto a partire da colonie tipiche risospese in 1 ml di Trypticase Soy Broth (TSB) con DNEasy Tissue Kit Qiagen. L'estratto è stato sottoposto ad una multiplex-PCR in grado di amplificare il DNA di *C. jejuni* e *C. coli* secondo un metodo descritto in letteratura (11), che prevede l'utilizzo di due coppie di primers specie specifici per *C. jejuni* e per *C. coli* che amplificano rispettivamente frammenti di 344 bp e 500 bp. **Conta delle enterobatteriacee** - Il latte è stato seminato direttamente in quantità di 100 µl tal quale e della diluizione 1:10 su terreno VRBGA, incubato per 24 ore per lo sviluppo di colonie caratteristiche. Il conteggio delle colonie in UFC è stato effettuato con un calcolo della media ponderata delle due successive diluizioni.

Genotipizzazione - I DNA estratti sono stati sottoposti a MLST secondo un metodo che evidenzia i polimorfismi a livello di singoli nucleotidi di sette geni housekeeping (1). L'assegnazione dei profili allelici, dei ST e dei CC è stata effettuata mediante il database MLST (<http://pubmlst.org/campylobacter/>).

RISULTATI

Esami batteriologici - Le indagini hanno evidenziato 31 campioni positivi per *Campylobacter* spp. su 258 campioni di latte di massa pari al 12 % (I.C. 95%: 10 -14). Tutti gli isolati sono stati identificati come *C. jejuni* tramite multiplex-PCR. La ricerca delle enterobatteriacee è risultata < 10 UFC/ml nel 5,8% dei campioni e con valori molto variabili compresi fra 10 e 30.000 UFC/ml nei restanti campioni. Il secondo campionamento di latte ed il campionamento di feci ambientali è stato effettuato in 16 delle 31 aziende positive. In 5 aziende è stata confermata la positività del latte di massa (31,3%) e un campione di feci ambientali è risultato positivo per *C. jejuni*. La conta delle enterobatteriacee sul latte di massa è stata analizzata in due gruppi di aziende: quelle dove il latte di massa è risultato ripetutamente positivo per *C. jejuni* (5 aziende) e quelle dove invece il secondo campionamento è risultato negativo (11 aziende). I valori limite e la mediana dei due gruppi sono risultati rispettivamente 10 - 673 UFC/ml (mediana: 73) e 73 - 30.000 UFC/ml (mediana 682) (Tabella 1).

Genotipizzazione - La genotipizzazione con MLST è stata eseguita su 23 dei 31 ceppi isolati. Il genotipo riscontrato con più frequenza corrisponde al complesso clonale 21, evidenziato in 9 dei 23 ceppi tipizzati (39,1%) seguito dal CC-48 (3 ceppi), CC-61, CC-206, CC-403 (2 ceppi), CC-42, CC-45, CC-22 e CC-658 con 1 ceppo per ciascuno (Figura 1).

Esito per <i>C. jejuni</i> del 1° e 2° prelievo (n. aziende)	Enterobatteriacee ufc/ml Range (mediana)
Positivo / Negativo (11)	73 – 30.000 (682)
Positivo / Positivo (5)	10 – 673 (73)

Tabella 1 – Risultato della conta delle Enterobatteriacee e della ricerca di *C. jejuni* al 2° prelievo dopo 30/90 gg in 16 aziende risultate positive per *C. jejuni* sul latte di massa.

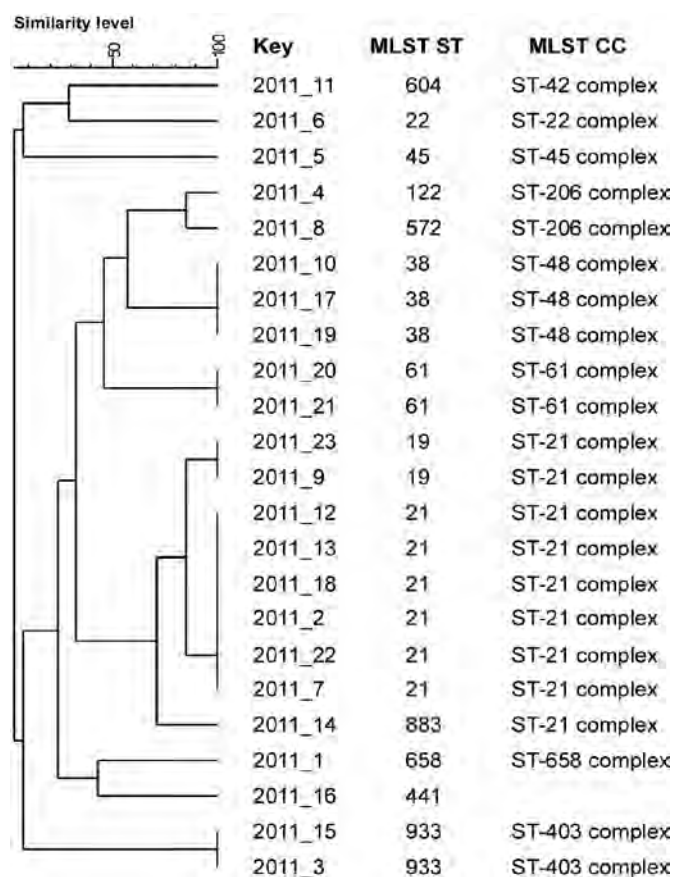


Figura 1 – Albero filogenetico dei 23 ceppi di *C. jejuni* isolati basato sulla analisi MLST.

DISCUSSIONE

I nostri risultati documentano una prevalenza di *C. jejuni* nel 12% dei campioni/aziende esaminati, una percentuale che appare rilevante anche rispetto ad analoghe indagini condotte negli USA che hanno messo in evidenza percentuali di positività comprese tra l'1% e il 9% (4,5). Un precedente studio da noi eseguito aveva evidenziato come la localizzazione, in alcune bovine, di *C. jejuni* a livello mammario possa essere causa di una persistente contaminazione del latte di massa aziendale (9). Nel presente studio è stata dimostrata una persistenza della contaminazione del latte di massa in 5 casi su 16 nei quali è stato effettuato un secondo campionamento a distanza di tempo. In queste 5 aziende la conta delle enterobatteriacee è risultata mediamente molto bassa a suggerire che fosse dovuta ad infezione mammaria di una o più bovine anziché a contaminazione fecale. Al contrario, nelle altre 11 aziende, data l'elevata presenza media di enterobatteriacee nel latte, si può pensare a contaminazione fecale occasionale come origine della positività del latte.

Inaspettatamente, i campioni di feci ambientali hanno dato esito positivo solo in un caso. Questa bassa percentuale di ritrovamento del *Campylobacter* nelle feci può essere semplicemente correlata all'inadeguatezza del campione (pool di 15 feci ambientali) ed influenzata anche dal fatto che l'eliminazione fecale mostra una periodicità stagionale con picchi segnalati tra giugno e novembre (7), mentre il nostro secondo campionamento è stato effettuato nei mesi invernali.

Per quanto riguarda l'analisi epidemiologico-molecolare, i ceppi di

C. jejuni presenti nell'area lodigiana corrispondono ai complessi clonali segnalati con maggior frequenza nei paesi dell'Unione Europea, cioè CC-61, CC-48, CC-42, CC-21. Inoltre abbiamo rilevato la presenza di CC-658 e ST-441, che in altri studi sembrano essere correlati principalmente alla malattia nell'uomo, CC-45 frequentemente isolato da campioni d'acqua, ma anche associato a cani, gatti, uomo e animali selvatici, e CC-206 diffuso in campioni animali e ambientali (8,10).

Una analisi spaziale del tutto preliminare della distribuzione dei diversi complessi clonali sul territorio della Provincia non evidenzia alcuna relazione fra ceppi appartenenti allo stesso Complesso Clonale, né diretta, né attraverso i corsi d'acqua che attraversano la provincia. Sono da verificare eventuali connessioni fra gli allevamenti come compravendita di animali o altre possibili forme di trasmissione indiretta.

La elevata prevalenza di *C. jejuni* nel latte bovino nonché la presenza di genotipi evidentemente correlati alla campilobatteriosi umana impone un attento monitoraggio di questa matrice alimentare quale importante veicolo di infezione per l'uomo anche alla luce della possibilità di una sua commercializzazione senza che sia sottoposta ad alcun trattamento termico. Ulteriori indagini sono inoltre necessarie per stabilire il ruolo patogenetico di *C. jejuni* nella patologia mammaria bovina.

Le ricerche sono state eseguite con il contributo del progetto Regione Lombardia 2009 RELOPROZOO

BIBLIOGRAFIA

- Dingle K.E., Colles F.M., Wareing D.R., Ure R., Fox A.J., Bolton F.E., Bootsma H.J., Willems R.J., Urwin R., and Maiden M.C. (2001). Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. J. Clin. Microbiol. 39:14-23.
- EFSA Journal (2011). 9(4):2105
- Ellis-Iversen J., Ridley A., Morris V., Sowa A., Harris J., Atterbury R., Sparks N., Allen V. (2011). Persistent environmental reservoirs on farms as risk factors for *Campylobacter* in commercial poultry. Epidemiol. Infect. 25:1-9.
- Jayarao B.M., Henning D.R. (2001). Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. J. Dairy Sci. 84(10):2157-62.
- Jayarao B.M., Donaldson S.C., Straley B.A., Sawant A.A., Hegde N.V., Brown J.L. (2006). A survey of foodborne pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in Pennsylvania. J Dairy Sci. 89(7):2451-8.
- Humphrey, T., O'Brien, S., Madsen M. (2007). *Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective. International Journal of Food Microbiology, 117, 237, 257.
- Kwan P.S., Birtles A., Bolton F.J., French N.P., Robinson S.E., Newbold L.S., Upton M., Fox A.J. (2008). Longitudinal study of the molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* in cattle on dairy farms. Appl. Environ. Microbiol. 74:3626-3633.
- Lévesque S., Frost E., Arbeit R.D., Michaud S. (2008). Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* isolates from humans, chickens, raw milk, and environmental water in Quebec, Canada. J Clin Microbiol. 46(10): 3404-11.
- Luini M., Benedetti V., Piccinini R., Vezzoli F. (2009). *C. jejuni* mammary infection in cattle: case report. Large Animal Review; 15(2):51-54.
- Manning G., Dowson C.G., Bagnall M.C., Ahmed I.H., West M., Diane G., Newell (2003). Multilocus sequence typing for comparison of veterinary and human isolates of *Campylobacter jejuni*. Appl. Environ. Microbiol. 69: 6370-9.
- Person S., Olsen K.E.P. (2005). Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. J. Med. Microbiol. 54: 1043-104.

MONITORAGGIO SULLA PRESENZA DI NOROVIRUS, VIRUS DELL'EPATITE A E CONTAMINAZIONE BATTERICA IN MOLLUSCHI EDULI LAMELLIBRANCHI NELLA REGIONE SARDEGNA

Bazzardi R., Fattaccio M.C., Canu A., Salza S., Marongiu E., Pisanu M.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Dipartimento di Igiene degli Alimenti, Sassari

Keywords: Norovirus (NoV), Edible Bivalve Molluscs (EBM), Real time PCR

SUMMARY – In compliance with EU regulations, the safety of shellfish products is evaluated according to bacteriological parameters (*Salmonella* and *E.coli*) as provided for by Regulation (EC) No. 2073/2005, biotoxicological parameters, as provided for by Regulation (EC) No. 853/2004, and chemical parameters, as provided for by Regulation (EC) No. 1881/06. This essay focuses on the evaluation of *NoV GI*, *NoV GII*, *Hepatitis A virus* (HAV), *E.coli* and *Salmonella spp.* concentration levels in Edible Bivalve Molluscs (EBM) populations, farmed from 2009 to 2011 in Sardinia Region (Italy).

INTRODUZIONE – È noto ormai da tempo che i prodotti alimentari possono trasmettere all'uomo agenti patogeni di natura sia batterica che virale, rappresentando di conseguenza un severo problema di Sanità Pubblica. Tra i principali alimenti causa di infezione e/o tossinfezione alimentare i MEL (molluschi eduli lamellibranchi) ricoprono un importante ruolo nella trasmissione di diverse patologie umane(3;8). Questi animali, in quanto organismi filtratori, durante la loro continua ed intensa attività di filtrazione hanno la capacità di trattenere e concentrare nel loro organismo non solo il plancton necessario al loro metabolismo, ma anche batteri, parassiti, microalghe tossiche e virus presenti nell'ambiente in cui vivono(4); per questo sono considerati tra gli alimenti più frequentemente implicati negli episodi e nei focolai di tossinfezione alimentare(6). La molluschicoltura in Sardegna è la principale attività di allevamento di specie ittiche nel comparto dell'acquacoltura la cui produzione è basata in prevalenza sull'allevamento di mitili, ostriche e vongole. A tutela della salute del consumatore sono state fissate delle norme igienico-sanitarie che garantiscono la salubrità del prodotto, prevedendo oltre alla classificazione delle acque dove i bivalvi vivono e/o sono allevati, anche l'obbligo di depurazione in specifici Centri Depurazione Molluschi (C.D.M.). La commercializzazione di questi prodotti è regolamentata dalle normative europee (Regolamenti CE n.853/04, 854/04, 2073/05, 2074/05, 1881/06 e successive modifiche ed integrazioni) che stabiliscono i requisiti igienici microbiologici, chimici (Reg. CE 2073/05 e Reg.1881/2006) e biotossicologici (Reg. CE 853/04). In particolare il Reg. 2073/05 fissa i requisiti microbiologici basandosi solo sulla determinazione di alcuni "parametri batteriologici" (*Salmonella spp.* ed *E.coli*). Lo stesso regolamento sottolinea però, che la determinazione degli indicatori fecali (non

correlabili tra loro ma i cui limiti ne determinano la commercializzazione), non può risultare affidabile per dimostrare l'assenza di contaminazione virale e per la valutazione dei tempi e dei processi di depurazione quando questi sono applicati. In Italia i casi riportati di gastroenterite infettiva in soggetti di tutte le età, da Epatite A (HAV) e Norovirus (NoV) sono ancora numerosi, con un'incidenza di 2 casi/100.000 abitanti(7). Entrambi i virus si diffondono per via oro-fecale; la dose infettante è molto bassa, generalmente 1-10 unità virali, inoltre hanno una elevata stabilità ambientale e diversamente dai batteri non si moltiplicano nell'alimento e non producono tossine; possono essere solo veicolati da questi al momento dell'ingestione(5). Poiché la produzione e la commercializzazione dei MBV destinati al consumo umano o alla trasformazione prima del consumo, è disciplinata dai regolamenti comunitari i quali fissano, come riportato sopra, solo i limiti di tollerabilità per i contaminanti microbiologici, chimici e biotossicologici, il presente lavoro vuole valutare, in questa categoria di alimento, il potenziale rischio riguardo alla presenza di contaminanti virali enterici valutando i dati in relazione alla presenza o assenza di batteri quali la *Salmonella spp.* e *E.coli*.

MATERIALI E METODI – L'indagine è stata condotta in ottemperanza con il Piano Regionale per la Vigilanza ed il Controllo Sanitario della produzione e Commercializzazione dei Molluschi Bivalvi e per la Sorveglianza delle Zone di Produzione e di Stabulazione di MBV del 2008 il cui piano è stato integrato nel Piano Nazionale Integrato del Ministero della Salute 2011-2014. Negli anni 2009, 2010 e nel periodo tra Gennaio e Giugno 2011 sono state effettuate un totale di n.5842 analisi, di cui n.1441 per *Norovirus* (GI, GII) e *Virus dell'Epatite A* (HAV), n.1126 per *E.coli* e n.1834 per *Salmonella spp.*. Le specie di molluschi bivalvi appartenevano alle seguenti specie: *Mytilus galloprovincialis* (cozza), *Tapes decussatus* / *semidecussatus* e *Tapes philippinarum* (Vongola verace) *Ostrea edulis* e *Crassostrea gigas* (Ostrica) (Tab.1). I campioni provenivano sia dalle Zone di classe A che di classe B della Regione Sardegna. I controlli microbiologici per la ricerca di *Salmonella spp.* ed il conteggio mediante metodo MPN di *E.coli* sono stati eseguiti utilizzando le metodiche analitiche UNI EN ISO 6579:2004 e ISO TS 16649-3:2005. Per i controlli virologici per la ricerca del Virus dell'Epatite A, NoV GI e NoV GII è stato utilizzato il protocollo one-step TaqMan

Real Time RT-PCR, fornito dal Reparto Adempimenti Comunitari e Sanità Pubblica – Laboratorio Nazionale di Riferimento (LNR) per il controllo delle contaminazioni virali dei molluschi bivalvi dell'Istituto Superiore di Sanità. Questo protocollo prevedeva la preparazione di tutti i campioni nel seguente modo: prelievo di 2.0 ± 0.2 g di epatopancreas da ciascun pool di MEL a cui sono stati aggiunti 2.0 ml di soluzione di proteinasi K (30 U/mg), incubati a 37.0 ± 1.0 °C in agitazione per 60 ± 5 min e successivamente sottoposti ad una seconda incubazione a 60.0 ± 2.0 °C per 15 ± 1 min in bagnomaria. E' stata eseguita una centrifugazione a 3000g per 5 min., successivamente è stato recuperato il surnatante e portato a volume di 3 ml con PBS sterile (pH 7.3). L'estrazione degli acidi nucleici è stata eseguita utilizzando il mini kit QIAamp® Viral RNA (Qiagen) seguendo le istruzioni del produttore per i campioni appartenenti al 2009. A partire dall'anno 2010 fino ad oggi, l'estrazione è stata effettuata utilizzando il protocollo NucliSENS® Magnetic Extraction miniMAG (Biomérieux) seguendo le indicazioni della casa produttrice. E' stato utilizzato il metodo in uso presso il LNR per la scelta dei primers e dei probes(2). La retrotrascrizione e la PCR Real Time one-step sono state effettuate con strumento ABI Prism 7700 e 7900 dell'Applied Biosystems. La retrotrascrizione è stata effettuata a 55° C per 60 min, seguita da denaturazione a 95° C per 5 min e da 45 cicli di PCR (denaturazione a 95° C per 15 s, annealing a 60° C per 1 min, extension a 65°C per 1 min). Ad ogni corsa sono stati affiancati due controlli negativi ed un controllo positivo costituito da RNA estratto da *Norovirus*. I campioni sono stati considerati positivi quando presentavano il $Ct \leq 44.0$ in almeno due repliche.

RISULTATI E DISCUSSIONE – I risultati ottenuti nel presente lavoro, riferiti ad un considerevole numero di analisi, rivelano interessanti dati analitici e per questo richiedono opportune considerazioni. La presenza di *NoV GI* è stata rilevata in n.121 campioni (8.4%) mentre *NoV GII* in n.396 dei n.1441 analizzati (27.5%). Il virus dell'Epatite A è risultato assente in tutte le prove. *Salmonella spp.* è risultata presente in n.17 campioni (0.9%) di cui n.15 in mitili (0.8%) e n.2 in vongole veraci (0.1%). *E.coli* è risultato presente in n.73 (6.5%) campioni di cui n.52 mitili (4.6%), n.2 ostriche (0.17%) e n.19 vongole veraci (1.73%) (Tab.2). Un solo campione ha presentato un valore di 230 MPN/100gr., proveniente da Zona di Classe A, mentre tutti gli altri campioni, provenienti da Zona di Classe B, avevano limiti superiori al limite di legge consentito di 4600 MPN/100gr.. È stata, di conseguenza, riscontrata la non conformità in tali campioni. Sono state messe in atto tutte le iniziative atte a ricostruire l'iter commerciale dei prodotti stessi e sono state informate le Autorità competenti per prendere i relativi provvedimenti contestualmente col detentore del prodotto e le ditte produttrici. Dall'analisi dei dati

relativi ai controlli batteriologici effettuati sui campioni di mitili commercializzati nella Regione Sardegna nel periodo considerato emerge che il rischio di infezione alimentare correlato al consumo di tali prodotti risulta molto modesto, con particolare riferimento a *Salmonella spp.*. La co-presenza di *Norovirus* ed *E.coli* è stata evidenziata solo in mitili (cozze) nell'anno 2010 in cui sono risultati positivi n.13 campioni. Diversi studi però, hanno dimostrato che l'impiego di indicatori fecali come *E.coli* non sia significativo per una valutazione indiretta della eventuale contaminazione da virus enterici in questi prodotti ittici. È interessante osservare che la presenza di questo patogeno al di sopra dei limiti di legge, è risultato essere presente in prodotti provenienti da zone ad elevato impatto antropico(1). Dai dati in nostro possesso, la co-presenza di entrambi i Genogruppi GI e GII di *Norovirus* è risultata: nel 2010 in n.62 campioni e fino a Giugno del 2011 in n.50 campioni. In conclusione si può affermare che il Piano Regionale di Sorveglianza e Vigilanza è in grado di assicurare il corretto controllo sanitario della produzione e commercializzazione dei MBV sul territorio regionale. La garanzia per il consumatore è data dai riscontri sfavorevoli da parte del Laboratorio che immediatamente informa le autorità competenti ai fini di procedere alla verifica delle condizioni di produzione e in casi particolari al ritiro del prodotto. In ultimo, i risultati di questa indagine dimostrano come la presenza di *Norovirus* nei molluschi bivalvi è un problema sanitario non marginale; le tossinfezioni alimentari provocate da questo patogeno sono in aumento e le aziende ittiche che allevano mitili bivalvi sono danneggiate dalla contaminazione di tali virus. Considerando l'elevata diffusione e l'elevata infettività sarebbe opportuno prevedere e studiare nuove misure di controllo del fenomeno come l'individuazione delle zone più a rischio e l'attuazione di tecnologie più sofisticate, innovative ed efficaci nei sistemi di depurazione.

Tabella 1 Analisi di MEL: IZS-Sardegna 2009-2010-2011

Numero analisi	NoV	HAV	E.coli	Salmonella spp.
Cozze	1294	1294	989	1713
Ostriche	53	53	31	22
Vongole	94	94	106	99

Tabella 2 Campioni positivi di MEL 2009-2010-2011

Campioni	NoV GI	NoV GII	HAV	E.coli	Salmonella spp.
Cozze	105	371	0	52	15
Ostriche	7	11	0	2	0
Vongole	9	14	0	19	2

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Corrian C., Arcangeli G., Fasolato L., Manfrin A., Rossetti E., Piazzzi E., Mioni R., Pavoni E., Losio N., Sanavio G., Sufredini E., Croci L. (2007). Influenze climatico-ambientali sulla presenza di virus enterici in molluschi bivalvi. *Ind. Alim.* XLVI, 277-283.
2. Croci L. – Reparto Adempimenti Comunitari e Sanità Pubblica – Laboratorio Nazionale di Riferimento per il controllo delle contaminazioni virali dei molluschi bivalvi. (2009). Protocollo operativo: Determinazione di Norovirus ed HAV in molluschi bivalvi mediante Real Time PCR.
3. Mesquita J.R., Vaz L., Cerqueira S., Castilho F., Santos R., Monteiro S., Manso C.F., Romalde J.L., Nascimento M.S.J. (2011). Norovirus, hepatitis A virus and enterovirus presence in shellfish from high quality harvesting areas in Portugal. *Food Microbiology* XXX, 1-6.
4. Oliveira J., Cunha A., Castilho F., Romalde J.L., Pereira M.J. (2011). Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives - A mini-review. *Food Control* 22, 805-816.
5. Patel M.M., Hall A. J., Vinjé J., Parashar U.D.. (2009). Noroviruses: A Comprehensive review. *Journal of Clinical Virology* 44, 1-8.
6. Terio V., Martella V., Moschidou P., Di Pinto P., Tantillo G., Buonavoglia C. (2010). Norovirus in retail shellfish. *Food Microbiology* 27, 29-32.
7. Ward R.L., Akin E.K. (1984). Minimum infectious dose of animal viruses. *CRC Crit. Rev.Environ. Contr.*, 14:2797-310.
8. Westrell T., Dusch V., Ethelberg S., Harris J., Hjertqvist M., Jourdan-da Silva N., Koller A., Lenglet A., Lisby M., Vold L. (2010). Norovirus outbreaks linked to oyster consumption in the United Kingdom, Norway, France, Sweden and Denmark, 2010. *Rapid Communications* – www.eurosurveillance.org, 1-4.

TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI *FRANCISELLA TULARENSIS* ISOLATI IN ITALIA

Vicari N.¹, Manfredini A. ¹, Prati P. ¹, Bellotti M. ¹, Barbieri I. ², Fabbi M.¹

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "B. Ubertini",

¹Sezione Diagnostica di Pavia - Centro di Referenza Nazionale per la Tularemia, ²Laboratorio di Analisi Genomiche, Brescia

Parole chiave: *Francisella tularensis*, genotipizzazione, MLVA

SUMMARY

MLVA analyses was applied to Italian collection of *F. tularensis* subspecies *holarctica* strains in order to investigate the genetic diversity of the isolates. Among seven VNTR loci examined, Ft-M3, Ft-M6 and Ft-M24 were the most informative. We obtained twelve different clusters by MLVA analyses, while sequence analyses of the 3 loci (FtM-3, Ft-M6 and Ft-M24) grouped the isolates in four clusters related to the source of infection. Interestingly, isolates from native hares grouped separately to those of imported hares. Our data increase the epidemiological information about the genetic diversity between the European and Italian strains of *F. tularensis* subsp. *holarctica*

INTRODUZIONE

Francisella tularensis è un batterio gram negativo intracellulare facoltativo agente eziologico della tularemia, una malattia zoonotica diffusa in tutto l'emisfero nord del mondo. Colpisce prevalentemente roditori e lagomorfi nei quali si manifesta solitamente con quadri di setticemia acuta rapidamente fatale. *F. tularensis* è in grado di infettare più di 100 specie tra cui mammiferi, anfibi, pesci e artropodi (7). L'infezione può avvenire per contatto diretto con animali infetti o i loro fluidi, attraverso il consumo di acqua o cibi contaminati, l'inalazione di aerosol infetto o tramite la puntura di artropodi in particolare zecche e zanzare. *F. tularensis* è uno dei batteri a più elevata capacità infettante conosciuti e per le sue caratteristiche è inserito nella lista A dei 6 agenti biologici più pericolosi utilizzabili a fini bioterroristici redatta dal Center for Disease Control and Prevention (3). Gli altri agenti inclusi sono *Y. pestis*, *C. botulinum*, *Variola major*, *B. anthracis* e i Virus delle Febbri Emorragiche (Ebola, Marburg, Lassa, ecc).

Ad oggi sono note 4 sottospecie di *F. tularensis*: *F. tularensis* subsp. *tularensis* (tipo A), *F. tularensis* subsp. *holarctica* (tipo B), *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* e *F. tularensis* subsp. *novicida* (8).

F. tularensis subsp. *tularensis* e *F. tularensis* subsp. *holarctica* sono quelle più patogene e quindi più importanti dal punto di vista zoonotico. La prima, altamente patogena, è confinata in Nord America anche se una segnalazione ne riporta l'isolamento anche in Europa pur senza altro seguito. La seconda, più moderatamente patogena, è presente in Europa, Asia e Nord America. *Francisella tularensis* è abbastanza resistente nell'ambiente (acqua e terreno) e nelle carcasse in decomposizione (alcune settimane). In particolare l'ambiente acquatico è considerato un importante ecosistema in grado di mantenere a lungo il batterio vitale attraverso i rapporti simbiotici con le amebe a vita libera al pari dei batteri del genere *Legionella*.

L'aumento delle conoscenze legate alla biologia molecolare ha portato all'acquisizione di preziose informazioni di ordine epidemiologico anche attraverso l'esame dei ceppi di *Francisella tularensis*. Queste nuove tecniche, attraverso lo studio di tratti del DNA batterico, consentono spesso anche

di stabilire l'associazione geografica del ceppo batterico esaminato e quindi dell'animale o della epidemia che ha generato. Questo è un aspetto sanitario non secondario dato che l'Italia è un forte importatore di lepri da diversi Paesi dall'Est Europa, un'area notoriamente endemica per la tularemia.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di applicare la metodica Multi-Locus VNTR Analysis (MLVA) come sistema di genotipizzazione che consentisse verificare la diversità genetica tra i ceppi circolanti in Italia e di creare un database Italiano.

MATERIALI E METODI

I ceppi di *F. tularensis* oggetto dello studio sono stati raccolti dal Centro di Referenza Nazionale per la Tularemia tra il 1964 e il 2011. Complessivamente sono stati esaminati 28 ceppi isolati da lepre, acqua e uomo. Due di questi provenivano dall'ex URSS frutto della storica collaborazione con il prof N. Olsufjev del Gamaleya Institute of Epidemiology and Microbiology di Mosca. È stato altresì aggiunto ai ceppi sottoposti al test anche un ceppo di riferimento di *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* (tipo A) avirulento (ATCC6223). Dato che alcuni dei nostri isolati risalivano anche a più di 40 anni fa, tutti i ceppi sono stati rivitalizzati in Cystine Heart Agar e da ciascun isolato è stato estratto il DNA utilizzando il kit commerciale DNeasy® Blood and Tissue kit (Qiagen, Milano). Il DNA è stato quindi esaminato per confermare l'identificazione di specie sia mediante PCR convenzionale e sia mediante Real-Time-PCR amplificando tre diversi target: i geni codificanti per una lipoproteina di 17kDa (6), per l'elicasi (2) e la regione genomica RD1 (1). Applicando quindi la metodica Multi Locus VNTR Analysis (MLVA) sono stati analizzati sette loci: Ft-M3, Ft-M4, Ft-M6, Ft-M10, M13, Ft-M20 e Ft-M24 (4). Ciascun locus è stato amplificato e sequenziato per poter valutare sia le dimensioni che il numero di ripetizioni (*repeats*). L'indice di discriminazione è stato calcolato mediante la formula di Hunter e Gaston (10). Inoltre, per verificare la stabilità dei loci, ed escludere eventuali variazioni dovute ai processi di isolamento e conservazione, tre differenti ceppi sono stati trapiantati ripetutamente per 10 volte e successivamente sottoposti all'analisi MLVA ad ogni passaggio. Infine è stata eseguita un'analisi filogenetica sulle sequenze dei loci Ft-M3, Ft-M6 e Ft-M24 mediante il software MEGA 5.0 (9).

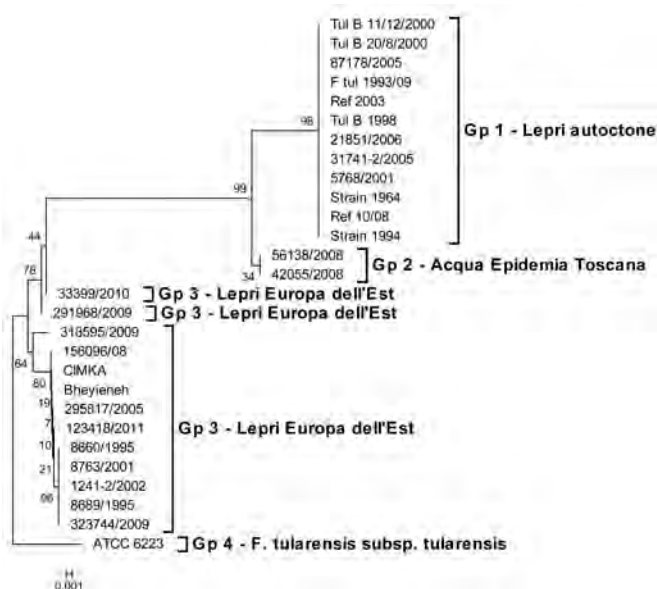
RISULTATI

Tutti i ceppi analizzati in questo studio sono stati identificati mediante amplificazione specie-specifica di tre differenti target (*tul4*, *elicasi* e *RD1*) come appartenenti alla specie *F. tularensis* subsp. *holarctica* (tipo B), ad eccezione del ceppo ATCC 6223 utilizzato come riferimento (ceppo avirulento classificato come *F. tularensis* subsp. *tularensis* - tipo A). L'analisi MLVA ha consentito di raggruppare i 28 ceppi in 12 differenti clusters. L'indice discriminatorio calcolato secondo la formula di Hunter e Gaston è di 0,85 (0,743-0,957 IC 95%). Il gruppo principale (12 isolati) proveniva da lepri autoctone,

mentre un altro grosso gruppo composto da cinque isolati proveniva da lepri importate dall'est Europa. I due ceppi isolati dall'acqua di fonte presentavano un unico profilo MLVA, mentre il resto dei ceppi si divideva in ulteriori 9 differenti cluster. Infine il ceppo di *F. tularensis* subsp. *tularensis* (ATCC 6223) mostrava, come atteso, un profilo nettamente diverso dagli altri.

L'analisi filogenetica condotta con il metodo statistico UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) con bootstrap (n°repliche 1000) su i loci Ft-M3, Ft-M6 e Ft-M24 ha confermato la presenza di 4 principali genotipi differenti. Nel genotipo 1 sono raggruppati tutti i ceppi isolati da lepri autoctone, nel genotipo 2 i ceppi isolati da una fonte d'acqua e legati ad una importante epidemia verificatasi in Toscana nel 2008, nel genotipo 3 i ceppi isolati da lepri importate da paesi dell' Europa dell'est ed infine il genotipo 4 che comprendeva il solo ceppo di *F. tularensis* subsp. *tularensis* (ATCC 6223) (Fig.1).

Fig.1: Albero filogenetico dei ceppi di *Francisella tularensis* isolati in Italia.



Infine, riguardo la possibilità di una variazione e/o alterazione del numero di ripetizioni abbiamo osservato stabilità all'interno dei singoli locus sia come lunghezza del frammento, sia come numero di ripetizioni.

DICUSSIONE E CONCLUSIONI

La metodica MLVA si è rivelata uno strumento molecolare altamente discriminatorio utile ad effettuare studi di tipo epidemiologico. Abbiamo, infatti, rilevato la presenza di una diversità genetica tra i ceppi di *F. tularensis* circolanti in Italia. In particolare, i ceppi isolati dalle lepri autoctone e quelli isolati dalle lepri importate dall'est Europa presentavano genotipi diversi tra di loro, suggerendo la presenza di ceppi di diversa origine. I ceppi isolati dalla fonte d'acqua toscana sono risultati filogeneticamente più vicini a quelli isolati dalle lepri autoctone, che definiremmo "nazionali", rispetto a quelli isolati dalle lepri importate, indicando una probabile origine comune dei due gruppi. I risultati ottenuti con la metodica MLVA sono stati rafforzati attraverso l'analisi filogenetica dei loci Ft-M3, Ft-M6 e Ft-M24, che si sono dimostrati quelli

maggiormente discriminatori tra i 7 scelti per la tipizzazione degli isolati di *F. tularensis*. L'elevato numero di clusters ottenuti malgrado i soli 28 ceppi analizzati sottolinea l'elevato potere discriminatorio dell'analisi MLV applicata in questo studio. Inoltre, la conferma della stabilità dei loci analizzati rende questo tipo di analisi affidabile e riproducibile.

Questo lavoro ha permesso la creazione del primo database italiano relativo ai ceppi di *Francisella tularensis* uno dei patogeni zoonotici noti a più elevata capacità infettante. Tale database, unito ad altre informazioni epidemiologiche (es provenienza dei ceppi e/o possibili collegamenti fra le diverse fonti d'infezione), consentirà di inquadrare con maggior precisione la fonte di contaminazione oltre alla possibilità di una collocazione geografica più precisa dei ceppi sia in presenza di casi di malattia degli animali che dell'uomo.

BIBLIOGRAFIA

1. Broekhuijsen M., Larsson P., Johansson A., Byström M., Eriksson U., Larsson E., Prior R. G., Sjöstedt A., Titball R. W., and Forsman M. (2003). Genome-Wide DNA Microarray Analysis of *Francisella tularensis* Strains Demonstrates Extensive Genetic Conservation within the Species but Identifies Regions That Are Unique to the Highly Virulent *F. tularensis* subsp. *Tularensis*. *J. Clin. Microbiol.*; 41 (7) 2924-2931.
2. Byström, M., Böcher, S., Magnusson, A., Prag, J. & Johansson, A. (2005). Tularemia in Denmark: identification of a *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* strain by real-time PCR and high-resolution typing by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *J. Clin. Microbiol.*; 43, 5355-5358.
3. Dennis DT, Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Fine AD, Friedlander AM, Hauer J, Layton M, Lillibridge SR, McDade JE, Osterholm MT, O'Toole T, Parker G, Perl TM, Russell PK, Tonat K (2001). Consensus statement. Working Group on Civilian Biodefense. *JAMA.*; 285(21):2763-2773.
4. Johansson A., Farlow J., Larsson P., Dukerich M., Chambers E. , Byström M. (2004). Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *J. Bacteriol.*; 186: 5808- 5818.
5. Johansson A., Forsman M., Sjöstedt A. (2004). The development of tools for diagnosis of tularemia and typing of *Francisella tularensis*. *APMIS*; 112: 898-907.
6. Johansson, A., L. Berglund, U. Eriksson, I. Göransson, R. Wollin, M. Forsman, A. Tärnvik, and A. Sjöstedt. (2000). Comparative analysis of PCR versus culture for diagnosis of ulceroglandular tularemia. *J. Clin. Microbiol.*; 38: 22-26.
7. Oyston PC. 2008. *Francisella tularensis*: unravelling the secrets of an intracellular pathogen. *J Med Microbiol.*; 57: 921-930.
8. Sjöstedt A. (2007). Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. *Ann. N Y Acad. Sci.*; 1105: 1-29.
9. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011). MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molec Biol Evol*; [Epub ahead of print].
10. Hunter P. R, Gaston M. A. (1988). Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems: an Application of Simpson's Index of Diversity. *J. Clin. Microbiol.*; 26 (11): 2465-2466.

DIAGNOSI DI *YERSINIA PESTIS* IN DUE BAMBINI MORTI DURANTE L'EPIDEMIA CHE COLPÌ IL REGNO DI NAPOLI TRA IL 1656 E IL 1658.

Fasanella A. ⁽¹⁾, Garofolo G. ⁽¹⁾, Scasciamacchia S. ⁽¹⁾, Mercurio V. ⁽¹⁾, Balestrucci A. ⁽²⁾, Bolsi I. ⁽³⁾, Giangrossi L. ⁽¹⁾, Serrecchia L. ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Centro di Referenza Nazionale per l'Antrace – Foggia

⁽²⁾ Università degli Studi di Napoli "Federico II", Facoltà di Medicina e Chirurgia – Napoli

⁽³⁾ Acquedotto Pugliese, Bari

Key words: *Yersinia pestis*, plague, epidemic

ABSTRACT

Yersinia pestis DNA has been detected from the dental pulp of unerupted teeth of 2 young people died during the plague epidemic occurred in Kingdom of Naples from 1656 to 1658. The finding from this study confirms that the plague occurred about half 17th century was due to *Yersinia pestis*

INTRODUZIONE

Un'epidemia di peste colpì il Regno di Napoli tra il 1656 e il 1658. In precedenza la malattia si era diffusa dall'Algeria alla Spagna, colpendo la città di Valencia nel 1647, poi quella di Aragona nel 1648 e infine la regione della Catalogna nel 1652. La peste comunque si diffuse anche a molte altre città spagnole. Successivamente l'epidemia raggiunse la Sardegna e da qui i territori delle città di Napoli, Roma e Genova. Per quanto riguarda il Regno di Napoli si ha notizia che nella capitale del Regno, i primi casi furono registrati tra Marzo e Maggio del 1656. Fonti storiche, inoltre, confermano che fu proprio Napoli la prima città ad essere colpita dall'epidemia che successivamente, nonostante le misure restrittive, si propagò in tutto il territorio del Regno (1,2).

Il 26 Maggio del 1656 la nave Sant' Andrea, proveniente da Napoli, approdò nel porto di Barletta. Nonostante i commissari sanitari dell'epoca l'avessero respinta in mare aperto, dopo alcuni giorni cominciarono a essere segnalati i primi casi di malattia.

La peste si diffuse molto rapidamente e raggiunse il picco ad Ottobre dello stesso anno. Da quel momento i casi cominciarono a diminuire e il 22 Giugno del 1657 Barletta fu dichiarata libera dalla peste.

In quasi un anno la malattia uccise tra le 7.000 e le 12.000 persone su una popolazione iniziale stimata intorno ai 20.000 abitanti. E' stato ipotizzato che quell'ondata di peste uccise in tutto il Regno di Napoli oltre 1,250,000 persone(1,2).

Nell'antica chiesa di Sant' Andrea in Barletta, nel corso dei lavori di restauro del 2009 e nella fase di pulizia dei sotterranei, sono emersi i resti (scheletri) di numerosissimi cadaveri. Questa scoperta ha confermato le fonti storiche che indicavano tale chiesa come uno dei sepolcreti comuni utilizzati all'epoca della peste.

La chiesa già in precedenza veniva utilizzata per ospitare tombe di nobili e di ricche famiglie del luogo che sono ancora oggi visibili.

MATERIALI E METODI.

Dopo aver ricevuto le autorizzazioni della Curia, è stato fatto un sopralluogo nei sotterranei della chiesa durante il quale sono stati identificati e raccolti 5 teschi di persone molto giovani.

Come controllo negativo è stato prelevato il teschio da una tomba risalente ad un'epoca antecedente l'epidemia.

Successivamente i teschi sono stati sottoposti ad esame radiografico per l'individuazione dei denti non erotti. (Fig.1). Tali denti sono stati asportati asetticamente.

Dopo un'accurata pulizia ciascun dente è stato diviso lungo la linea sagittale per mettere allo scoperto la polpa dentale. L'idratazione della polpa dentale mummificata è avvenuta in PBS pH 7.2 per 48 h a 37°C.

Il DNA è stato estratto usando il DNAeasy Blood and Tissue kits (Qiagen). Come controllo screening per verificare l'avvenuta estrazione e la presenza di sostanze inibenti è stato utilizzato un test PCR specifico per il DNA mitocondriale umano (3).

Per la diagnosi di *Yersinia pestis* sono state adottate due "suicide PCR" con primers specifici per *pla gene*, una "Sybr green PCR" in real time secondo il protocollo indicato da Skottman *et al.* modificato (4) e una PCR convenzionale in accordo con il metodo indicato da Drancourt *et al.* (5). Per la ricerca di DNA di *Bacillus anthracis* sono state utilizzate PCR di tipo convenzionale utilizzando primers specifici per *pag gene* e *capC gene* (6) e per *Salmonella enterica* serovar *Typhi* utilizzando primers specifici per *narG gene* (7).

Per evitare cross contaminazioni, in tutti i processi di amplificazione è stato sempre utilizzato il controllo negativo mentre non è mai stato utilizzato quello positivo.

Tutti gli ampliconi dei sospetti positivi sono stati sottoposti ad analisi di sequenza.

RISULTATI

Sono stati analizzati 26 denti provenienti da cinque teschi di bambini di un'età compresa tra 5 e 12 anni. Il test PCR real time Sybr green specifico per *pla gene* di *Yersinia pestis* ha evidenziato la positività in 7 campioni e di questi solo due sono risultati positivi al test PCR convenzionale (Fig. 2).

Tutti i campioni sono risultati negativi per *B. anthracis* e *Salmonella*. I risultati del GenBank BLAST relativo alle due sequenze sugli ampliconi delle PCR convenzionali hanno evidenziato una omologia del 100% con le sequenze di riferimento (GenBank accession no. AL109969.1). Tali sequenze sono state depositate in GenBank e visibili al numero di accesso JN208020-JN208021.

CONCLUSIONI

La presenza di DNA di *Yersinia pestis* in due denti provenienti da due teschi distinti e quella sospetta nei rimanenti tre indica che queste persone morirono di peste durante l'epidemia che colpì Barletta tra il 1656 e il 1657. Sebbene non sia universalmente accettato che tutte le ondate di pestilenza avvenute nel passato siano da addebitare a *Yersinia pestis*, diversi lavori hanno confermato che l'agente che causò tra il 16^{mo} e il 18^{mo} secolo le diverse ondate di Black Death in Europa sia appunto tale batterio.

Yersinia pestis è stata confermata in 10 siti localizzati in 5

paesi europei e utilizzando approcci metodologici diversi (8). In Italia è stata confermata a Venezia (14^{mo} – 17^{mo} secolo) (8), Genova (Bastione dell'Acquasola) (14^{mo} secolo) (9), e Parma (16^{mo} - 17^{mo} secolo) (10). Le fonti storiche indicano che l'epidemia di peste che investì Barletta si sviluppò dopo l'arrivo di una nave partita da Napoli quando l'epidemia si era già diffusa, pertanto sulla base di questo dato possiamo ritenere che *Yersinia pestis* è l'agente responsabile dell'epidemia che colpì il Regno di Napoli tra il 1656 e il 1658.

RINGRAZIAMENTI

Grazie al Mons. Giovan Battista Pichierri Arcivescovo della Diocesi di Trani – Barletta – Bisceglie - Nazareth, a Mons. Saverio Pellegrino e a Mons. Giuseppe Paolillo della Diocesi di Trani – Barletta – Bisceglie – Nazareth.

Si ringrazia Aceti Angela, Calvio Salvatore e d'Errico Rosa per il loro supporto tecnico.

Il progetto è stato realizzato grazie ai fondi della Ricerca Corrente 2010 del Ministero della Salute

BIBLIOGRAFIA

1. Fusco I. Plague, demography and taxation in the Kingdom of Naples of XVII century [in Italian], Franco Angeli Ed., Milan, 2007
2. Fusco I. The plague of 1656-58 in the Kingdom of Naples: diffusion and mortality [in Italian] Popolazione e Storia. 2009; 1: 115
3. Matheson CD, Vernon KK, Lahti A, Fratpietro R, Spigelman M, Gibson S, Greenblatt CL., Donoghue HD. Molecular Exploration of the First-Century Tomb of the Shroud in Akladama, Jerusalem. PLoS ONE 2009; 4(12): e8319
4. Skottman T, Piiparinen H, Hyytiäinen H, Myllys V, Skurnik M, Nikkari S. Simultaneous Real Time PCR detection of *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* and *Yersinia Pestis*. Eur. Journ. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2006; 26: 207 – 211
5. Drancourt M, Aboudharam G, Signoli M, Fozzati L, Dutour O, Raoult D. Detection of 400-year-old *Yersinia pestis* in human dental pulp: an approach to the diagnosis of ancient septicemia. Proc.Natl. Acad. Sci. 1998; 95:12637-12640.
6. Fasanella A, Losito S, Trotta T, Adone R, Massa S, Ciuchini F, Chiocco D, Detection of anthrax vaccine virulence factors by Polymerase Chain Reaction. Vaccine 2001; 19: 4214 – 4218
7. Papagrigorakis MJ, Yapijakis C, Synodinos PN, Baziotopoulou-Valavani E. DNA examination of ancient dental pulp incriminates typhoid fever as a probable cause of the Plague of Athens. International Journal of Infectious Diseases 2006;10: 206—214
8. Tran TNN, Signoli M, Fozzati L, Aboudharam G, Raoult D, Drancourt M, High throughput, multiplexed pathogen detection authenticates plague waves in medieval Venice, Italy, PLoS One 2011; 6(3):e1673
9. Cerutti N, Marin A, Rabino Massa E Plague in ancient remains: an immunological approach. In: Plague: Epidemics and Societies. Signoli M, Cheve' D, Adalian P, Boetsch G, Dutour O, eds. Frizenze University Press. 2007; 238–241.

10. Haensch S, Bianucci R, Signoli M, Rajerison M, Schultz M, et al., Distinct clones of *Yersinia pestis* caused the Black Death. PLoS Pathog. 2010; 6: e1001134.

Fig 1. Radiografia di uno dei teschi prelevati nei sotterranei della Chiesa di Sant ' Andrea in Barletta. Il cerchio in giallo evidenzia un dente non eretto.

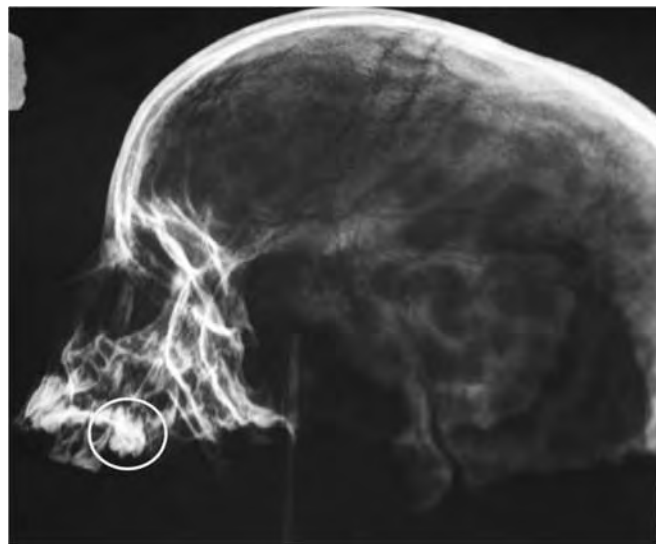
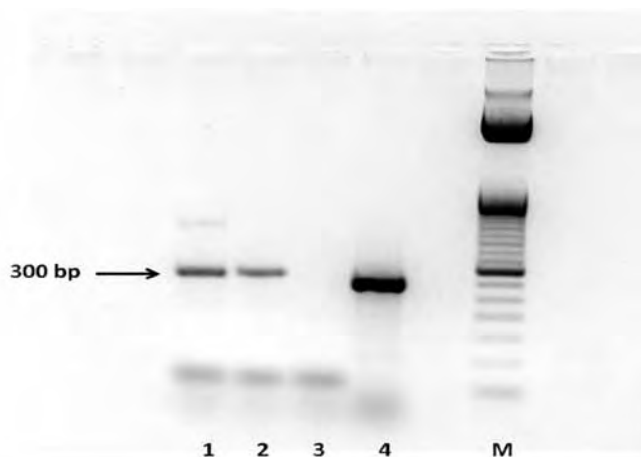


Fig. 2. Elettroforesi in gel di agarosio di prodotti PCR con primers specifici per *pla* gene (300 bp) di *Yersinia pestis*. M: size marker; 1 – 2: campioni di DNA provenienti da denti non eretti di due bambini; 3: controllo negativo; 4: controllo positivo (amplificato a parte) .



FOOD AUTHENTICITY TESTING: THE ROLE OF THE LABORATORY

M^a Isabel González Alonso

*Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. SPAIN*

Recent food scares (e.g. BSE, avian flu, dioxins, etc.), malpractices of some food producers, religious reasons and food allergies have tremendously reinforced public awareness regarding the composition of food products. However, because labels do not provide sufficient guarantee about the true contents of a product, it is necessary to identify and/or authenticate the components of food, thus protecting both consumers and producers from illegal substitutions. An authentic food is defined as a food that conforms to the description provided by the producer or processor in terms of composition, processing and origin, in compliance with the legal requirements. According to European law (Regulation EC 178/2002), food traceability is a key instrument of food authenticity and means the ability to track any food, feed, food producing animal or substance that will be used for consumption through all stages of production, processing and distribution. The identification of the species present in a food (food speciation) is a basic issue in food authenticity with special significance in processed food for which discrimination of different ingredients is difficult.

Species verification in food labels is performed for a variety of reasons, including economic, health and religious/cultural. The entire or partial substitution of species of high commercial value by similar but lower value species represents a commercial fraud, leading to unfair competition and consumer deception. Besides, mislabelling of food products may be objectionable for health reasons, since consumption of products containing undeclared constituents can cause allergy problems in sensitized individuals. The European Commission has established a list of 14 food allergens which should be labelled whenever they, or ingredients made from them, are used at any level in pre-packed foods (cereals containing gluten, crustaceans, molluscs, eggs, fish, peanuts, nuts, soybeans, milk, celery, mustard, sesame, lupin and sulphur dioxide). Other health-related concerns of food authenticity are recent food scares like bovine spongiform encephalopathy (BSE), which have emphasized reinforcement of species traceability in feedstuffs to protect consumer's health. Furthermore, the information given to consumers is essential for them choosing certain foods over others. That choice may be reflection of lifestyles such as vegetarianism, religious practices such as Jew and Muslims where pork meat should be absent, or objections against any genetic modification of foods. When considering all referred matters, the need for reliable methods which allow fast and unequivocal identification of food components is a crucial aspect for consumers, food industries and food authorities.

The analytical methods currently used for species identification in food and feed mainly rely on protein and DNA analysis. Protein-based methods include electrophoretic and chromatographic techniques, and immunological assays. Immunoassays take advantage of the specific antigen-antibody interaction and offer quick test time, easy-to-use procedure and low cost compared to other protein-based approaches. Particu-

larly ELISA (enzyme-linked-immunosorbent assay) is the most widely used technique for animal and plant species identification due to its specificity, sensitivity, possibility of quantification and high throughput screening. An essential advantage of ELISAs relies on the possibility to adapt the assays to easy-to-use stable commercial kits (microtiter plate- or immunostick-based) containing all the necessary components for rapid species verification at any point of the food supply chain. The "lateral flow" tests (membrane-based) are also extended kits for food component identification. The simplicity of both type of tests and the short time required for analysis make them suitable for the screening of a large number of raw and cooked food samples. Some biotechnological companies that commercialize these kits for food and feed species identification are Cortecs Diagnostics Ltd. (London, UK), ELISA Technologies Inc. (Gainesville FL, USA), Diagnostic Innovations (Chester, UK), R-Biopharm (Darmstadt, Germany), Neogen Corporation (Lansing, MI, USA), etc.

In the last years, DNA molecules have been the target compounds for species identification due to their high stability compared with the proteins. The ability of DNA to withstand environmental and temperature influences and its presence in most biological tissues, make it the molecule of choice for differentiation and identification of components in processed products, and a good alternative to protein analysis. Some of the major challenges facing genetic food authenticity testing are the recovery of DNA in highly processed or complex matrices, the development of methods that are more simple, rapid and inexpensive for routine use in regulatory setting, the simultaneous identification of a wide range of species in a food, and the quantification of a species in a mixed sample. To meet such requirements, most DNA-based methods rely on the highly specific amplification of one or more DNA fragments by the polymerase chain reaction (PCR). This technique presents a high potential for animal and plant species identification due to its fastness, simplicity, specificity and sensitivity. The sensitivity feature of the PCR does mean that the assay is susceptible to contamination, although this can be minimized. Appropriate laboratory practices, such as having different areas for pre- and post-PCR sample manipulation, are routinely adopted in laboratories where large amounts of work are undertaken. Another important consideration of PCR is the need to target short amplicons, as they provide higher template DNA stability in physically and chemically processed food and feed products.

Amplification of DNA fragments with species-specific primers (species-specific PCR) followed by agarose gel electrophoresis for fragment size verification, is the simplest PCR strategy applied to evaluate the presence of a species in a product. Additional confirmation methods and/or examination of PCR products can be accomplished by sequencing of DNA amplicons (PCR-sequencing), analysis of PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), analysis of random amplified polymorphic DNA (RAPD), or more recent strategies like lab-on-

a-chip technology with capillary electrophoresis and real-time PCR. These latter techniques eliminate the need for gel electrophoresis and offer greater potential for new applications in food speciation research. Future trends also point to the use of the microarray technology (DNA chips) or the "DNA barcoding" technology. Whichever the technique used, the availability of databases has become increasingly important for food authentication, providing a compilation of genetic information of numerous species. As happens with ELISAs, advances in PCR-based methods during the last years have led to the development of different commercial kits for rapid testing of raw and processed food from animal and vegetal origin. For example, Biomerieux (France) has developed the first high density DNA chip (FoodExpert-ID) for the simultaneous detection of 33 animal species (mammalian, fish and avian) in food and feed. This and other DNA-based kits from other companies (DNA Genotek, Kogene Biotech, Applied Biosystems, Bionostra, etc.) contain all the necessary reagents, controls and accessories for rapid authenticity testing and can be used by regulatory agencies to detect species adulteration and enforce national and trans-national laws.

Both PCR and ELISA-based techniques may provide a reliable means for species assignment in food products. ELISA has the advantage over PCR of being less expensive and more practical for routine use in the field, allowing faster processing of a high number of samples without the need of steps such as digestion and/or DNA purification from food. However, a widely reported limitation of immunoassays is that proteins may be denatured on processing and heating, leading to loss of analytical specificity. PCR techniques combine specificity and a higher sensitivity than ELISAs, and detect species DNA in highly degraded matrices.

Besides the mentioned molecular techniques, multiresidue analytical methodologies like those based on stable isotope analysis are emerging tools for assessing the geographical origin of animal and plant food products, which is another relevant topic of food authenticity. Particularly IRMS (isotope ratio analysis-mass spectrometry) is most often used, and looks for the changes in the characteristic isotopic profiles of stable isotopes of common elements (hydrogen, oxygen, carbon and nitrogen), that are highly dependent on the geographical and climatic condition of each region. Also, spectrophotomet-

ric techniques like NIR (near infrared spectroscopy) and MIR (middle infrared spectroscopy) are rapid non-destructive techniques based upon absorption of electromagnetic radiation by the organic matter and, thus, yield information (spectral data) about the types of molecules present in a food. These techniques are useful to measure trace food components, and have also application to identify the geographical location of foods.

Each with its own pros and cons, the methodologies quoted herein show sufficient advantages in terms of reliability, speed, sensitivity and specificity to find application in food authenticity testing. However, in most cases, the feasibility of their use in the food and feed industry is still today dependent on the lowering of instrument and running costs. The emerging synergy between nanotechnology and biosensors is giving rise to more sophisticated, rapid and sensitive devices for continuous monitoring of a wide range of target food compounds. Thus, it is likely that the potential of these methodologies will continue to grow and can be adopted as complementary regulatory tools to allow farm to fork traceability and discourage food adulteration in the marketplace.

REFERENCES

- Asensio, L., González, I., García, T. and Martín, R. (2008). Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control* 19, 1-8.
- Bottero, M.T. and Damalosso, S. (2010). Animal species identification in food products. Evolution of biomolecular methods. *Veterinary Journal*. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023310003151>
- Mafra, I., Ferreira, I.M. and Oliveira, M.B. (2008). Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology* 3, 649-665.
- Primrose, S., Woolfe, M. and Rollinson, S. (2010). Food forensics: methods for determining the authenticity of food-stuffs. *Trends in Food Science and Technology* 21, 582-590.
- Regulation (EC) no 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety.
- Schwägele, F. (2005). Traceability from a European perspective. *Meat Science*, 71, 164-173.

ISTOLOGIA E FRODI ALIMENTARI: UN METODO ACCURATO E ROBUSTO PER IDENTIFICARE LO STATO DI CONSERVAZIONE DEI PRODOTTI ITTICI

Bozzetta E., Pezzolato M., Cencetti E., Meloni D., Abramo F.¹, Mutinelli F.,² Ingravalle F., Teneggi E.M.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta- SC Istopatologia e Test Rapidi, Torino

¹Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi e Igiene degli alimenti - Università degli studi di Pisa

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie-Laboratorio Istopatologia, Legnaro, -, Padova

Key words: : Histopathology, fish, fresh/ frozen, fraud

SUMMARY

Authentication of the condition of fish as fresh or thawed is compulsory, according to EU Regulations 104/2000 and 2065/01, both to avoid frauds in retailing frozen fish as fresh, and for food safety, with regards to the microbiological risk in thawed products. Besides this freezing is mandatory according to EU Regulation 853/2004 to prevent infestation from nematodes in fish intended for raw consumption. We developed a robust and accurate histological method to distinguish between fresh and frozen/thawed fish to be adopted in official laboratories for fraud monitoring.

INTRODUZIONE

La crescente domanda in qualità e salubrità degli alimenti richiede metodi diagnostici innovativi sia per verificare la rispondenza dei prodotti alla legislazione vigente sia per informare correttamente il consumatore. A questo proposito l'autenticazione del pesce come fresco/congelato è obbligatoria in base ai Regolamenti EU 104/2000 (2) e 2065/01(3), sia per prevenire le frodi commerciali che comportano la vendita di pesce pregiato come fresco anche se scongelato, sia per ridurre il rischio microbiologico legato a procedure di congelamento, stoccaggio e scongelamento non propriamente eseguite. La frode è comunemente perpetrata soprattutto nella vendita al dettaglio per prolungare la vita commerciale delle specie più pregiate.

D'altra parte il trattamento con abbattitore termico per non meno di 24 ore a -20°C è prescritto per tutti i prodotti ittici destinati al consumo come crudi o soggetti ad un trattamento considerato inefficace nel prevenire problematiche sanitarie del consumatore relative alla potenziale infestazione da parte di nematodi. L'*Anisakiasi* è la nematodiasi più diffusa nel Mar Mediterraneo, con prevalenze d'infestazione fino al 70% (1) in alcune specie di largo consumo.

La dichiarazione non corretta dello stato di conservazione del pesce rappresenta una frode frequente ai danni del consumatore, a causa della mancanza di metodi efficaci di identificazione da parte del veterinario ispettore o comunque non dotati delle caratteristiche di accuratezza indispensabili a farne uno strumento di indagine affidabile. Scopo del presente lavoro è verificare le performance del test istologico per identificare lo stato di conservazione del pesce (fresco/congelato), verificandone la

rispondenza ai requisiti di un metodo di screening ufficiale come richiesto dal Regolamento 882/2004.

MATERIALI E METODI

Sono stati campionati dal Mar Ligure le seguenti specie: orata (*Sparus auratus*), triglia (*Mullus barbatus*) e pesce spada (*Xiphias gladius*). Centoquarantadue campioni di muscolo di ogni specie sono stati tagliati in sezioni di 0.5 cm di spessore: una metà di ciascun campione è stata fissata in formalina immediatamente, l'altra è stata ripartita in 3 gruppi per ogni specie; i tre gruppi sono stati congelati per 12 ore a -80°C e poi stoccati a -20°C per periodi diversi (15, 30 e 42 giorni); infine tutti i campioni sono stati scongelati a -4°C per 12 ore e quindi fissati in formalina.

Ogni campione è stato tagliato in 3 parti e ognuna di queste posta in una biocassetta identificata con numero progressivo e un numero da 1 a 3. Una procedura operativa standard (POS) che descrive la metodologia di campionamento, di processazione, di colorazione e lettura è stata allestita e distribuita con i campioni a 3 laboratori istologici italiani deputati alla diagnosi delle malattie dei pesci e ai controlli in ambito di sicurezza degli alimenti.

Ogni campione è stato localmente processato, tagliato al microtomo e colorato in ematossilina-eosina. Le sezioni sono state osservate al microscopio ottico a 10X da un istopatologo esperto e classificate come positive (congelate) o negative (fresche).

La dimensione campionaria è stata determinata ipotizzando sensibilità e specificità del metodo pari a 0.9 e un errore massimo di 0.1. I risultati delle letture sono stati inseriti in un dataset da ogni laboratorio e analizzati utilizzando STATA 10.1.

In seguito ai risultati conseguiti è stato effettuato un ulteriore campionamento di 35 specie di pesci diverse per verificare se i criteri diagnostici adottati nel primo studio potessero essere estesi a tutte le specie nonché alla valutazione dell'avvenuto processo di congelamento richiesto ai fini della bonifica dei prodotti ittici da potenziali infestazioni (-20°C per 24 ore). A tal fine sono stati analizzati 113 campioni in parte immediatamente fissati in formalina ed in parte sottoposti a congelamento a -20°C per 24 ore e a -80° per 24 ore. In seguito tutti i campioni sono stati scongelati e fissati in formalina. Ogni campione è stato riposto in una biocassetta, identificato con numero progressivo, quindi processato per l'esame istologico in base alla POS dedicata. I

Tab 1. 1° esperimento – Identificazione istopatologica dello stato di conservazione del pesce (fresco/congelato) - accuratezza
Sensibilità (Se) e Specificità (Sp) con IC95%

	Lab 1 <i>Sparus aurata</i>		Lab 2 <i>Sparus aurata</i>		Lab 3 <i>Sparus aurata</i>		Lab 1 <i>Mullus barbatus</i>		Lab 2 <i>Mullus barbatus</i>		Lab 3 <i>Mullus barbatus</i>		Lab 1 <i>Xiphias gladius</i>		Lab 2 <i>Xiphias gladius</i>		Lab 3 <i>Xiphias gladius</i>	
Congelato	71	0	71	0	68	3	66	4	66	4	67	3	70	1	71	0	71	0
Fresco	0	71	0	71	0	71	1	71	3	69	2	69	4	67	0	71	0	71
Se% (95%CI)	100 (94,9-100)		100 (94,9-100)		95,8 (88,1-99,1)		94,3 (86,0-98,4)		94,3 (86,0-98,4)		95,7 (88,0-99,1)		98,6 (92,4-100)		100 (94,9-100)		100 (94,9-100)	
Sp% (95%CI)	100 (94,9-100)		100 (94,9-100)		100 (94,9-100)		98,6 (92,5-100)		95,8 (88,3-99,1)		97,2 (90,2-99,7)		94,4 (86,2-98,4)		100 (94,9-100)		100 (94,9-100)	

Sensibilità media 97,63% (95%IC: 91,14% - 99,45%); Specificità media 98,44% (95%IC: 92,43% - 99,69%)

preparati sono stati osservati da 3 lettori esperti. La dimensione campionaria è stata calcolata in 101 campioni, poi innalzata a 113 per evitare perdite di risultati. Il valore è stato ottenuto ipotizzando un k pari a 0.75 e la stessa proporzione, pari a 0.75, di campioni valutati come positivi da tutti gli esperti con una precisione assoluta di 0.15

RISULTATI

La Fig. 1 illustra il quadro istopatologico riscontrato in condizioni di freschezza e congelamento: nel secondo caso si osservano, a livello citoplasmatico, spazi a margini netti otticamente vuoti.

I risultati di accuratezza e precisione del metodo relativamente al primo studio evidenziano elevati valori di sensibilità e specificità per tutti e 3 i laboratori ed anche la concordanza risulta ottima avendo 0.87 come limite inferiore dell'intervallo di confidenza (Tab.1 e 2). Durante le analisi condotte sui campioni del secondo esperimento si sono riscontrati in una piccola percentuale di campioni quadri microscopici non sicuramente riferibili né a congelamento né a freschezza, rendendo così necessaria l'introduzione di una nuova classe "non conclusivo (NC)". I risultati delle letture sono riportati nelle tab. 3 e 4.

Tab 2. 1° esperimento- Identificazione istopatologica dello stato di conservazione del pesce (fresco/congelato) - precisione Kappa di Cohen con IC95%		
<i>Sparus aurata</i>	Lab2	Lab3
Lab1	1,00 (0,84-1)	0,96 (0,79-1)
Lab2		0,96 (0,79-1)
	Kappa-combined = 0,97 (0,88-1)	
<i>Mullus barbatus</i>	Lab2	Lab3
Lab1	0,86 (0,69-1)	0,89 (0,72-1)
Lab2		0,83 (0,66-0,99)
	Kappa-combined = 0,86 (0,76-0,95)	
<i>Xiphias gladius</i>	Lab2	Lab3
Lab1	0,93 (0,77-1)	0,93 (0,77-1)
Lab2		1,00 (0,84-1)
	Kappa-combined = 0,95 (0,86-1)	

Kappa-combined (95%CI): 0,93 (0,87 – 0,98)

Tab 4. 2° esperimento- precisione Kappa di Cohen con IC95%				
1° Esperto	2° Esperto			
	Congelato	Fresco	NC	
Congelato	69	7	2	
Fresco	2	28	1	
NC	4	0	0	
	Kappa di Cohen = 0,69 (0,52 – 0,86)			
1° Esperto	3° Esperto			
	Congelato	Fresco	NC	
Congelato	67	1	10	
Fresco	4	26	1	
NC	3	0	1	
	Kappa di Cohen = 0,65 (0,50 – 0,80)			
2° Esperto	3° Esperto			
	Congelato	Fresco	NC	
Congelato	66	0	9	
Fresco	5	27	3	
NC	3	0	0	
	Kappa di Cohen = 0,64 (0,49 – 0,79)			

Kappa-combined (95%CI): 0,66 (0,57 – 0,75)

Tab 3. 2° esperimento- accuratezza Sensibilità (Se) e Specificità (Sp) con IC95%						
Gold standard	1° Esperto		2° Esperto		3° Esperto	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos
Congelato	82	4	78	8	84	2
Fresco	0	27	0	27	2	25
	95,4 (88,5-98,7)		90,7 (82,5-95,9)		97,7 (91,9-99,7)	
	100 (87,2-100)		100 (87,2-100)		92,6 (75,7-99,1)	

Sensibilità media 94,57% (95%IC: 87,62% -98,11%);
Specificità media 97,53% (95%IC: 83,39% - 99,70%)

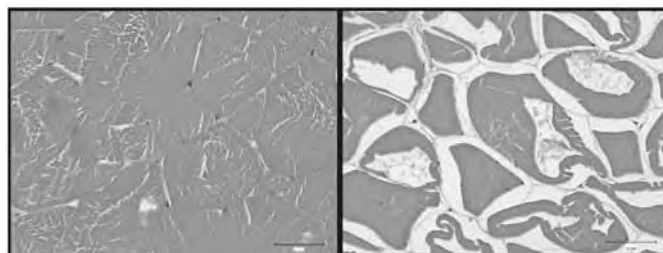


Fig.1. Orata (*Sparus aurata*). Sezione istologica di muscolo colorata con ematossilina-eosina: a- fresco; b-congelato

CONCLUSIONI E DISCUSSIONE

Dichiarare in etichetta lo stato di conservazione del prodotto ittico è obbligatorio sia al fine di rispondere ai requisiti legislativi sia per rassicurare il consumatore. La vendita di prodotto ittico congelato per fresco è una frode sia commerciale, sia sanitaria, così come la vendita di pesce destinata al consumo tal quale (es. carpaccio, sushi) non sottoposta ad abbattimento termico. Abbiamo sviluppato un metodo diagnostico semplice ed efficace nell'identificare correttamente lo stato di conservazione del prodotto ittico.

Nella valutazione sono state incluse sia le specie di largo consumo in Italia che quelle con caratteristiche di composizione in grasso e proteine molto diverse, ai fini di valutare la robustezza del metodo su varie matrici.

I risultati ottenuti dimostrano che l'esame istologico è uno strumento molto accurato per distinguere il pesce fresco dal pesce decongelato, indipendentemente dalla specie in esame.

Inoltre i laboratori coinvolti nello studio hanno ottenuto ottimi risultati sia di accuratezza che di precisione pur avendo eseguito le analisi senza essere stati sottoposti ad una preventiva formazione. La metodica, in corso di accreditamento, risulta quindi idonea per la prossima adozione nei piani di controllo ufficiale.

Ulteriori ricerche saranno finalizzate ad ottimizzare il metodo anche su matrice soggetta a trattamento di marinatura o affumicatura e a ridurre al minimo la durata dell'analisi, al fine di poterla applicare entro i limiti di vita commerciale del prodotto.

RINGRAZIAMENTI

La ricerca è stata parzialmente finanziata dal Ministero della Salute IZSPLV 06/07RC.

Si ringraziano i veterinari ispettori per i prelievi sul territorio (Dr. Gili Stefano e Dr. ssa Granatiero Daniela ASLTO1; Dr. Moschi Roberto ASL1 Imperia; Dr. Canova Alessandro ASL3 Genova; Dr. Dini Valter ASL2 Savona; Dr. Orlandi Mino ASL5 La Spezia)

BIBLIOGRAFIA

1. Puente P., Anadaon A.M., Rodero M., Romaris F., Ubeira F.M., Cuellar M. (2008). *Anisakis simplex*: the high prevalence in Madrid and its relation with fish consumption. *Experimental Parasitology*, 118:271-271
2. Regolamento (ce) n. 104/2000 del Consiglio del 17/12/ 1999 relativo all'organizzazione comune dei mercati nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura
3. Regolamento (CE) n. 2065/2001 della Commissione del 22/10/ 2001 che stabilisce le modalità d'applicazione del regolamento (CE) n. 104/2000 del Consiglio per quanto concerne l'informazione dei consumatori nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura

L'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE ITTICHE A TUTELA DELLA SALUTE DEL CONSUMATORE E DELLA QUALITÀ DEL PRODOTTO: INDAGINE SUL MERCATO ITALIANO NEGLI ANNI 2009-2011

Magnabosco C., Civettini M., De Battisti C., Cattoli G. e Arcangeli G.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie- Legnaro (Pd);

Keywords: Frodi alimentari, prodotti ittici, PCR.

INTRODUZIONE: In questi ultimi anni la richiesta di prodotti della pesca è notevolmente aumentata. A seguito della globalizzazione dei mercati ed alla conseguente importazione da ogni parte del mondo di prodotti ittici, deve essere posta particolare attenzione alla conformità delle specie rispetto a quanto dichiarato in etichetta.

Se una specie ittica viene sostituita con un'altra, il danno per il consumatore è prima di tutto di tipo economico-commerciale (sostituzione con una specie di minor pregio). Sono possibili anche risvolti che possono causare danni alla salute del consumatore come è il caso di sostituzione con specie tossiche. Le normative in materia di rintracciabilità dei prodotti ittici (Reg. CE 104/2000, Reg. CE 2065/2001, Reg. UE 178/2002) nonché i principi ispiratori dei Regolamenti UE n. 852, 853 e 854/2004 applicati dal gennaio 2006 ed i decreti nazionali sulla corretta nomenclatura in Italia sono la dimostrazione di come oggi più che mai il consumatore ha il diritto di conoscere quello che giunge sul suo piatto, ed essere tutelato. L'ultimo D.M. Mipaaf emanato il 23 dicembre 2010 (G.U. n.11 del 15-1-2011) è stato integrato da un comunicato pubblicato sulla G.U. n. 125 del 31-5-2011. In totale, le specie oggetto di nomenclatura ufficiale in Italia sono 934.

Negli anni 2009-2011 sono stati analizzati dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie prodotti ittici in commercio presenti sul mercato nazionale per verificare la corrispondenza della nomenclatura dichiarata alla vendita di varie specie ittiche con metodo PCR seguito da sequenziamento. La percentuale di prodotto non conforme è stata pari al 32%.

SUMMARY: during these last decade, the globalization has modified rapidly the fishery products trade. For this reason, nowadays the consumer is more exposed to the frauds for species substitution. The traceability of fishery products is planned in EU Regulations (Reg. CE 104/2000, Reg. CE 2065/2001, Reg. UE 178/2002) and must be applied in all EU countries. In this study we investigated the presence of frauds in Italian markets, in the period: 2009-2011. The analysis were carried out with PCR method and every sample has been sequenced. The results demonstrate the presence of 32% samples not in according with the declared species. No toxic species were recovered.

MATERIALI E METODI: I campioni sono stati analizzati secondo il seguente approccio: 1) in caso di specie dichiarate presenti anche nella banca delle specie ittiche dell'istituto (cp conservati in alcool 70 °C identificati a partire da pesci interi e classificati in base alle caratteristiche morfologiche secondo le chiavi FAO da personale qualificato), la prova è stata eseguita in doppio con l'omologo campione di riferimento. 2) in caso di specie non presenti nella banca delle specie ittiche dell'istituto si è proceduto in singolo.

Geni target utilizzati per l'analisi di sequenziamento: Citocromo ossidasi I (COI) e Citocromo B (CytB). Entrambi fanno parte

del genoma mitocondriale e sono utilizzati comunemente nell'ambito della filogenetica molecolare presentando dei polimorfismi di sequenza adatti alla discriminazione di specie. Oggi il COI è considerato il locus di riferimento delle maggiori campagne internazionali di barcoding (BOLD), ciò ha fatto sì che nei database pubblici siano presenti sequenze di riferimento certe per un numero molto elevato di specie. Nel nostro laboratorio quindi si usa di routine amplificare e sequenziare un tratto di circa 700 paia di basi di tale locus. In casi particolari viene amplificato e sequenziato anche un tratto di circa 360 bp del CytB per esempio quando un'elevata degradazione del DNA del campione di partenza non permette l'amplificazione di un tratto di lunghezza maggiore o quando la limitata variabilità interspecifica del COI in alcuni generi (es. *Thunnus*) non garantisce la discriminazione di specie mediante l'esclusiva analisi della sequenza di tale locus. Il DNA del campione in esame è stato estratto mediante il kit QIAampDNA Mini Kit (QIAGEN) seguendo le istruzioni fornite dal produttore. Le reazioni di amplificazione hanno compreso per entrambi i loci 1 U di Platinum Taq DNA polymerase, (Invitrogen), 1 X di PCR rxn Buffer (Invitrogen), 2.5 mM di MgCl₂, 0.25 mM di ciascun dNTP, 0.5 mM di entrambi i primers e 5 ml di DNA estratto, per un volume finale di 50 ml. Primers utilizzati: COI_{fishF1} 5'-TCAACYAATCAYAAAGATATYGGCAC-3' e il COI_{fishR1} 5'-ACTTCYGGGTGCCRAARAATCA-3' (Fish Barcode of Life Initiative, FISH-BOL) per il COI e CytB1 5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3' e CytB2 5'-gccctcagaatgatattgtcctca-3' (Carr S.M., Marshall H.D., 1991) per il cytB. L'amplificazione è stata eseguita nel termociclatore GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) con le seguenti condizioni: 2 min a 95°C; 30 sec a 95°C, 30 sec a 52°C e 1 min a 72°C per 35 cicli; 10 min a 72°C. L'avvenuta amplificazione è stata rilevata successivamente a corsa elettroforetica in gel di agarosio all'1% addizionato di Bromuro d'Etidio (0.5 mg/ml), mediante esposizione a luce UV e acquisizione dell'immagine con apparato GelDocXR (Biorad). Dettaglio della prova di sequenziamento: Il prodotto di amplificazione ottenuto è stato quantificato e purificato per poter essere sottoposto alla reazione di sequenziamento. La purificazione è stata ottenuta tramite l'uso del kit commerciale "ExoSap-IT" (USB) seguendo le indicazioni del fornitore. Nel caso di prodotti di PCR contenenti bande multiple e aspecifiche, si è proceduto con l'estrazione della banda della lunghezza attesa tramite l'uso del kit "Qiaquick Gel Extraction" (Qiagen) e la sua successiva quantificazione.

L'amplificato purificato è stato quindi sottoposto a reazione di sequenziamento utilizzando entrambi i primers di amplificazione, ottenendo così due sequenze complementari (figura del ferogramma). Per la reazione di sequenziamento si è utilizzato il kit "BigDye Terminatorv3.1 Cycle Sequencing" (Applied Biosystems) in un volume finale di 10 µl contenenti: 1 µl di primer specifico (concentrazione 3.3 µM), 1,5 µl di Sequencing Buffer, 1 µl di TRRM, da 1 a 6,5 µl di DNA (a seconda della quantità dell'amplificato). La mix così ottenuta

è stata sottoposta ad una reazione di PCR con le seguenti condizioni termiche: 25 cicli di 96°C per 10 secondi, 50°C per 5 secondi e 60°C per 2 minuti.

Il prodotto di amplificazione della reazione di sequenza è stato successivamente purificato per la rimozione dei reagenti in eccesso. A seconda del numero di amplificati da sequenziare sono stati utilizzati due diversi kit commerciali: "AutoSeq G-50 Dye Terminator Removal" (GE-Healthcare) nel caso di un numero limitato di amplificati, "Performa DTR Ultra 96-Well Plates (Edge Biosystem)" nel caso di un numero elevato di amplificati da analizzare. I campioni così ottenuti sono stati caricati nel sequenziatore (ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) per l'elettroforesi capillare. Le sequenze ottenute (figura della sequenza) sono state analizzate con i software dedicati Sequencing Analysis 5.2 e SeqScape v2.5 seguendo le specifiche del fornitore.

RISULTATI E DISCUSSIONE:

Nel triennio 2009-2011, su un totale di n. 200 campioni analizzati e tutti sequenziati, n. 64 sono risultati non conformi alla specie dichiarata, pari ad una percentuale del 32 %. Le specie più oggetto di sostituzione sono state:

Merluzzo (*Merluccius merluccius*), sostituito con Merluzzo sudafricano e altre specie; Cernia (e Cernia atlantica, oggetto di varie sostituzioni; Platessa (*Pleuronectes platessa*), sostituita da Passera del Pacifico (*Lepidopsetta polixistra*) e Limanda (*Limanda aspera*); Tonno rosso (*Thunnus thynnus*), sostituito da Tonno a pinne gialle (*Thunnus albacares*); Polpo (*Octopus vulgaris*), sostituito da Polpo messicano (*Octopus maya*), Polpo indopacifco (*Octopus aegina* e *Octopus cyanea*); Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), sostituito da Pangasio (*Pangasius hypophthalmus*); Dentice (*Dentex dentex*), sostituito con varie specie.

La frode di gran lunga più frequente è stata quella per sostituzione con specie di minor pregio come nel caso di merluzzi, cernie e platasse. La tipologia di presentazione di queste specie è spesso profondamente modificata: bastoncini, tranci, filetti panati che si prestano appunto a facile frode. Non sono state trovate sostituzioni con specie tossiche con dirette implicazioni sulla salute del consumatore.

RINGRAZIAMENTI: Il presente lavoro è stato condotto anche grazie alla collaborazione di Eurofishmarket S.r.l.

BIBLIOGRAFIA

1. Arcangeli G., Corrain C., Boscolo S., Fasolato L., Manfrin A., Monne I., Paparella A. e Giorgini S., 2007, Prodotto ittici trasformati. Così si identificano le specie, Alimenti e Bevande, 11-12, 50-58.
2. Bentur Y., Ashkar J., Lurie Y., Levy Y., Azzam Z.S., Litmanovich M., Golik M., Gurevych B., Golani D. e Eisenman A., 2008, Lessepsian migration and tetrodotoxin poisoning due to *Lagocephalus sceleratus* in the eastern Mediterranean, Toxicon, 52, 964–968.
3. Carr S.M. e Marshall H.D., 1991, Detection of Intraspecific DNA Sequence Variation in the Mitochondrial Cytochrome b Gene of Atlantic Cod (*Gadus Morhua*) by the Polymerase Chain Reaction, Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 48, 1, 48-52.
4. Simon K.D., Mazlan A.G. e Usup G., 2009, Toxicity of puffer fishes (*Lagocephalus wheeleri* Abe, *tabeta* and *kitahama*, 1984 and *Lagocephalus sceleratus* Gmelin, 1789) from the east coast waters of Peninsular Malaysia. J. Biol. Sci., 9, 482-487.
5. Zaki M.A., El Wahab A. e Mossa A., 2005, Red sea puffer fish poisoning: Emergency diagnosis and management of human intoxication. Egypt. J. Aquat. Res., 31, 370-378.

IMPIEGO DEL DNA BARCODING PER L'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE DI PESCI IN ITALIA

Cutarelli A., Amoroso M.G., Girardi S., De Roma A., Guarino A., Galiero G., Corrado F.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Via Salute 2, Portici (NA)

Keywords: DNA mitocondriale, identificazione di specie, DNA barcoding**ABSTRACT**

We carried out bi-directional sequence analysis to try to unambiguously classify the most common fishes traded in Italy, mainly all populating the Mediterranean sea. In particular, we sequenced two standard barcode regions of mitochondrial cytochrome b gene (*cyt b*) and cytochrome oxidase subunit I gene (*COI*). With both the genes we could correctly identify the species of almost all (31/32) the samples in study.

INTRODUZIONE

L'identificazione di specie rappresenta un aspetto fondamentale della sicurezza alimentare nei prodotti ittici. In Italia questo problema è particolarmente sentito per i prodotti trasformati (ad es. filetti di pesce panati) per la frequente sostituzione di specie di valore elevato con altre di valore più basso e la conseguente errata dichiarazione in etichetta. La corretta determinazione di specie ha notevoli applicazioni a tutela dei consumatori, essa può infatti essere anche utilizzata nella individuazione di specie potenzialmente tossiche o allergizzanti così come di specie provenienti da aree inquinate da bio-tossine termoresistenti.

Nel nostro paese le specie di pesce sono identificate attraverso valutazione delle caratteristiche morfologiche (Legge No. 125 del 25.03.1959). Purtroppo però tale identificazione è impossibile per i prodotti trasformati, (che rappresentano in Italia circa la metà del pesce consumato), in cui i caratteri morfologici sono ormai inesistenti (1). In tale contesto appare chiara la necessità di disporre di un metodo analitico che consenta di analizzare qualsiasi prodotto alimentare a base di pesce (indipendentemente dal processo tecnologico subito) e fornire indicazioni veloci e chiare sulle specie di pesce che lo compongono allo scopo di garantire il consumatore sulle origini e la sicurezza dei prodotti alimentari ittici consumati. A questo riguardo, si stanno sviluppando in maniera molto rapida negli ultimi anni metodi molecolari di indagine (DNA barcoding) che si basano sull'analisi di sequenze polimorfiche di DNA del genoma mitocondriale. Il DNA barcoding è già impiegato con successo per l'identificazione di specie in molti campi: medico, forense, alimentare, (2). I maggiori vantaggi di questo tipo di analisi sono l'elevata sensibilità (detection anche di poche molecole di DNA), la presenza di differenze nelle sequenze di DNA anche tra specie filogeneticamente molto correlate, nonché l'elevata resistenza degli acidi nucleici ai processi tecnologici alimentari tipici dei prodotti ittici (affumicatura, cottura, acidificazione, salagione, congelamento) (3, 4). Nel presente lavoro abbiamo analizzato, tramite DNA barcoding, 32 prodotti ittici costituiti prevalentemente da pesci (interi o tranci) pescati nel Mar Mediterraneo (30 campioni). Abbiamo poi anche analizzato dei prodotti trasformati (2 filetti di pesce panati) con lo scopo di valutare l'applicabilità del DNA barcoding anche a questo tipo di preparazioni. Come markers genetici abbiamo impiegato il gene del citocromo b (*cyt b*) e il gene del citocromo ossidasi sub unità I (*COI*) dal momento che queste sequenze mitocondriali sono quelle maggiormente impiegate per l'identificazione di specie nei pesci (1, 3, 5).

MATERIALI E METODI**2.1 Campionamento ed analisi morfologica**

I campioni sono stati raccolti dalla sezione di Salerno dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno. Laddove possibile i Veterinari della sezione hanno effettuato l'identificazione di specie sulla base delle caratteristiche morfologiche. Ogni campione è stato fotografato dorsalmente e ventralmente per catturare tutti dettagli utili ai fini della identificazione. In seguito i campioni sono stati inviati (previo congelamento) al laboratorio di Analisi del Genoma, presso la sede centrale dell'Istituto Zooprofilattico.

2.2 Estrazione del DNA e PCR

IL DNA è stato estratto dai campioni in esame (200 mg) mediante il kit "High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche®)". Il DNA mitocondriale da *cyt b*) e *COI* è stato amplificato mediante i primers indicati in tabella 1.

Tabella 1. Primers impiegati per la PCR e il sequenziamento

Target	Primers
cyt b 435 bp	<i>cyt bF</i> : 5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3' <i>cyt bR</i> : 5'-CCCCTCAGAAATGATATTGTCTCA-3' (6)
COI 616 bp	<i>FishF1</i> : 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGGCAC-3' <i>FishR1</i> : 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3' <i>FishF2</i> : 5'-TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC-3' <i>FishR2</i> : 5'-ACTTCAAGGGTAACCGAAGAATCAGAA-3' (7,8).

La mix di reazione (50µL) includeva: 25µL di Master Mix 2x (Applera), 1µL di ogni primer (10µM), 18µL di acqua DNase/RNase free e 100 ng del DNA estratto. Il profilo termico di reazione per i primer FishF1/FishR1 era il seguente: 1° step di denaturazione di 15 min a 95°C, 35 cicli di: 30 sec a 94°C, 40 sec a 52°C, e 1 min a 72°C, uno step di elongazione finale di 10 min a 72°C. Il profilo termico per i primer FishF2/FishR2 prevedeva, rispetto al suddetto, solo un differente step di annealing (54°C per 30 sec invece di 52°C per 40 sec). Il profilo termico di reazione per i primers *cyt bF/cyt bR* era invece: 1° step di denaturazione di 15 min a 95°C, 40 cicli di: 1 min a 95°C, 30 sec a 48°C, 1 min a 72°C e uno step di elongazione finale di 7 min a 72°C. I prodotti di PCR dopo essere stati visualizzati su un gel di agarosio al 2% sono stati sottoposti a sequenziamento.

2.3 PCR di sequenziamento e DNA barcoding

I prodotti di PCR sono stati purificati mediante Qiaquick PCR purification Kit (Qiagen) e successivamente sottoposti a PCR di sequenziamento bi-direzionale utilizzando il kit di sequenziamento ABI PRISM Big Dye3.1 Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) secondo le istruzioni contenute nel kit. Le sequenze sono state poi purificate del Dye terminator mediante DyeEX 2.0 spin kit (Qiagen) e infine sottoposte a elettroforesi capillare con lo strumento ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Gli

Elettroferogrammi sono stati analizzati mediante software SeqScape v.2.5 (Applied Biosystems). Le sequenze ottenute dal gene *COI* sono state analizzate attraverso il BOLD Identification System (IDS) (www.boldsystems.org). Le sequenze ottenute dal gene *cyt b* sono state invece allineate con quelle depositate in BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.org>).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Ciascun campione in esame è stato sottoposto ad analisi di sequenza con entrambi i markers genetici *COI* e *cyt b*. Mediante analisi del *COI* è stato possibile identificare, inserendo le sequenze ottenute in IDS BOLD, 26 dei 30 campioni di pesce (intero o in trancio) in studio. L'analisi delle sequenze del gene *cyt b*, allineate in BLAST, ha consentito invece di identificare 27 dei 30 campioni di pesce in esame. In particolare con il *COI* non si è riusciti a identificare le 3 differenti specie di *Pagellus* in analisi: *erythrinus*, *bogaraveo* e *acarne*, mentre con il *cyt b* sono state identificate le due specie di *Carangoides* campionate: *gymnostethoides* e *fulvoguttatus*. In ogni caso, impiegando ambedue i marcatori, è stato possibile identificare geneticamente la specie di tutti i campioni di pesce in analisi tranne uno. Dei campioni analizzati, infatti, solo una specie non ha trovato corrispondenza né in BLAST né in IDS BOLD: la *Trigla lucerna* ovvero la "gallinella". Ciò può essere dovuto al fatto che tale specie non era mai stata esaminata fino ad ora e di conseguenza la sua sequenza non era mai stata depositata in nessuno dei due database. Per quanto riguarda i 2 prodotti trasformati in esame, sia *COI* che *cyt b* hanno rilevato la presenza in entrambi di *Merluccius merluccius*. Le specie identificate, con il relativo marcatore, sono riportate in tabella 2.

Tabella 2 Specie di pesce identificate mediante DNA barcoding

ORDINE	FAMIGLIA	GENERE	SPECIE	Marker genetico
Gadiformes	Gadidae	Micromesistius	poutassou	cyt b/COI
Gadiformes	Phycidae	Phycis	blennoides	cyt b/COI
Gadiformes	Merlucciidae	Merluccius	paradoxus	cyt b/COI
Gadiformes	Merlucciidae	Merluccius	capensis	cyt b/COI
Gadiformes	Merlucciidae	Merluccius	hubbsi	cyt b/COI
Gadiformes	Merlucciidae	Merluccius	merluccius	cyt b/COI
Perciformes	Sparidae	Pagellus	acarne	cyt b
Perciformes	Scombridae	Thunnus	albacares	cyt b/COI
Perciformes	Sparidae	Pagellus	erythrinus	cyt b
Perciformes	Sparidae	Pagellus	bogaraveo	cyt b
Perciformes	Carangidae	Carangoides	gymnostethoides	COI
Perciformes	Carangidae	Carangoides	fulvoguttatus	COI
Perciformes	Triglidae	Trigla	lyra	cyt b/COI
Lophiiformes	Lophius	Lophius	piscatorius	cyt b/COI
Perciformes	Xiphidae	Xiphias	gladius	cyt b/COI

Ogni specie analizzata ha mostrato di avere una sequenza genica diversa da quella delle altre specie e chiaramente identificabile mediante DNA-barcoding. Il DNA barcoding è un'indagine genetica semplice da effettuare perché include le più comuni tecniche molecolari (estrazione del DNA, PCR e sequenziamento): è proprio la loro associazione che rende la metodica un tool di successo per l'identificazione di specie e per la tracciabilità dei prodotti alimentari ittici. Sistemi di tracciabilità basati su indagini molecolari si rivelerebbero molto utili specialmente nell'identificazione della composizione di prodotti trasformati, che più facilmente sono oggetto di frode (poiché le parti del pesce non sono più morfologicamente riconoscibili). In conclusione, con il presente lavoro è stato

possibile eseguire un'autenticazione genetica di alcune specie di pesce aventi elevato valore commerciale in Italia. L'analisi è stata realizzata mediante lo studio di alcune sequenze geniche mitocondriali che caratterizzano in maniera pressoché univoca molte specie viventi. Un'importante risvolto dello studio effettuato è dato dalla possibilità di contribuire al progetto DNA barcode. Moltissimi laboratori in tutto il mondo concorrono, infatti, ogni giorno ad arricchire il database di sequenze appartenenti a nuove specie identificate, dando un aiuto importante agli studi filogenetici e tassonomici sugli organismi viventi.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Kochzius M., Seidel C., Antoniou A., et al. 2010. Identifying fishes through DNA BARcodes and Microarrays. Plos One. 5 (9), 1-15.
- 2) Botti S., Giuffra E. 2010. Oligonucleotide indexing of DNA barcodes: identification of tuna and other scombrid species in food products. BMC biotechnology. 10:60.
- 3) Hajibabaei M, Smith MA, Janzen D H, Rodriguez JJ, Whitfield J B, Hebert PDN (2006) A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. Molecular Ecology 6: 959–964.
- 4) Hebert PDN, Cywinska A, Ball S L, de Waard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London B 270: 313–322.
- 5) Hubert N, Hanner R, Holm E, Mandrak NE, Taylor E, , Burrig M, Watkinson D, Dumont P, Curry A, Bentzen P, Zhang J, April J, Bernatchez L (2008) Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. PLoS ONE 3(6): e2490. doi:10.1371/journal.pone.0002490
- 6) Burgener M, Hübner P (1998) Mitochondrial DNA enrichment for species identification and evolutionary analysis Zeitschrift Fur LebensmittelUntersuchung UndForschung a Food Research and Technology 207, Issue: 4, Pages: 261-263.
- 7) Ward RD, Zemlak TS, Innes BH., Last PR, Hebert PDN (2005) DNA barcoding Australia's fish species. Philosophical Transactions of the Royal Society B. 360: 1847-1857.
- 8) Ivanova NV, Zemalk Tyler S, Hanner RH, Hebert PDN (2007) Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. Molecular Ecology Notes 7: 544-548.

RICERCA E QUANTIFICAZIONE DI DNA BOVINO IN MOZZARELLA DI BUFALA MEDIANTE REAL-TIME PCR

Maccabiani G., D'Amico S., Fusini F., Finazzi G., Daminelli P., Bertasi B., Losio M. N., Varisco G.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna
Reparto Tecnologia Acidi Nucleici Applicata agli Alimenti, Brescia*

Keywords: Real-Time PCR, mozzarella, DNA

SUMMARY

Molecular biology techniques have been widely used for species identification in food in recent years. The PCR allows to detect DNA of different species by amplification of a species-specific DNA fragment. Furthermore, Real-Time PCR allows to quantify the DNA target by species-specific probes which emit fluorescence at several wavelengths. In this work Real Time PCR has been tested to detect and quantify bovine DNA in home-made mozzarellas produced with mixtures of bovine and buffalo milk in different ratio, and in some commercial mozzarella cheese.

INTRODUZIONE

L'identificazione di specie nei prodotti a base di latte è estremamente importante sia da un punto di vista commerciale che sanitario. In particolar modo in Italia dove sono presenti molti prodotti caseari a Denominazione di Origine Protetta (DOP), la cui produzione è regolata da normative europee che ne prescrivono le fasi di lavorazione ma soprattutto le materie prime costituenti. Un esempio fra questi è la "mozzarella di bufala campana DOP" la cui valenza economica è rilevante e che deve essere prodotta utilizzando esclusivamente latte di bufala (Regolamento EC n° 1107/96). Per tutelare questi prodotti è quindi importante avere a disposizione strumenti che non solo ne permettano il controllo sulla base dei criteri microbiologici di sicurezza alimentare, ma che rapidamente riescano a confermarne l'autenticità. Da questo punto di vista quindi assume grande importanza la ricerca di latte vaccino nelle mozzarelle di bufala campana DOP.

A tal proposito le metodiche di biologia molecolare consentono di effettuare analisi rapide, sensibili e specifiche fornendo strumenti adeguati per l'identificazione di specie nei prodotti a base di latte. Nel caso delle mozzarelle sono state approntate analisi basate sul pattern proteico dei campioni, come ad esempio isoelectrofocusing (IEF) (3), ELISA (6) o HPLC (5), e basate sull'analisi del DNA (estratto dalle cellule somatiche presenti nel latte), come la multiplex-PCR (1,8), la PCR-RFLP (2) e la Real Time PCR (4). I geni mitocondriali sono largamente utilizzati come target in queste reazioni di PCR in quanto sono presenti in molte copie nelle cellule aumentando di conseguenza la sensibilità dei metodi, soprattutto in presenza di scarso materiale genetico oppure degradato dai processi produttivi a cui è stato sottoposto il campione.

La Real Time PCR permette di affiancare ad un risultato qualitativo (presenza/assenza) anche una quantificazione del DNA bersaglio e quindi, nel caso specifico, consente di discriminare fra una contaminazione in tracce di latte non dichiarato (perciò economicamente irrilevante), e presumibilmente dovuta a cause accidentali, da una contaminazione più consistente (perciò economicamente rilevante) e presumibilmente volontaria.

A tale scopo sono state preparate artificialmente in laboratorio cagliate di latte bufalino (*Bubalus bubalis*) e bovino (*Bos taurus*) in diversi rapporti ed analizzate in una reazione di Real Time PCR per valutarne l'accuratezza, ma soprattutto la capacità del metodo di discriminare piccole contaminazioni da altre più marcate e quindi poter riconoscere casi di evidenti frodi alimentari. Contemporaneamente sono state analizzate alcune mozzarelle di bufala prelevate dalla grande distribuzione.

MATERIALI E METODI

Preparazione mozzarelle – Le mozzarelle sono state preparate con latte bufalino crudo a cui è stato aggiunto latte bovino crudo nei seguenti rapporti: 50%, 20%, 8%, 5%, 2%. In particolare in un primo momento sono state prodotte le mozzarelle al 50%, 20% e 5% (vedi risultati tabella 3 Real Time 1-5) e in un secondo momento i campioni all'8%, al 5% e al 2% (vedi risultati tabella 3 Real Time 6-10). Inoltre in entrambi i casi sono state preparate una mozzarella di puro latte bufalino (utilizzata come controllo negativo di processo) e come standard per la quantificazione in Real Time PCR mozzarelle al 100%, al 10% e all'1% di latte bovino. I campioni di latte crudo utilizzati per la preparazione sono stati previamente portati a 37°C in bagnomaria. Successivamente sono state preparate le miscele di latte bovino e bufalino nei rapporti indicati per un volume finale di 100 ml, a cui sono stati aggiunti 40 µl di caglio bovino. I campioni sono stati mantenuti a temperatura ambiente in lenta agitazione. La cagliata prodotta, dopo l'eliminazione del siero, è stata conservata in cella a 4 °C per almeno 48 ore prima dell'estrazione del DNA.

Estrazione del DNA – Sono stati prelevati 200 mg da ogni cagliata prodotta ed il DNA è stato estratto secondo le procedure previste dal kit specifico per prodotti alimentari "Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food" (Promega). Il materiale genomico così ottenuto è stato conservato a 4°C per poi essere analizzato nella reazione di PCR.

Real Time PCR – La reazione di Real Time PCR è stata approntata utilizzando i primer specifici per la specie bovino "BOS F" e "BOS R" (7), amplificanti un frammento di 112 bp del gene mitocondriale 16SrRNA, (concentrazione finale 300 nM) e la sonda MGB "Bovino Probe" marcata all'estremità 5' con il fluoroforo "FAM" (concentrazione finale 100 nM). Le sequenze di primer e sonde sono specificate in tabella 1.

Tabella 1: sequenze dei primer e della sonda

	SEQUENZA
BOS F	5' TTGAAC TAGACCTAGCCCCAAAGATAC 3'
BOS R	5' GCCGTACTTAGATTTCTATCTCC -3'
Bovino probe	5' TCTCGACTAAACAACCAAG 3'

Nella mix di reazione sono stati introdotti anche i controlli interni di amplificazione EXO IPC Mix ed EXO IPC DNA (Applied Biosystems), per un volume finale di 23 μ l. A questi sono aggiunti 2 μ l di DNA estratto. Il ciclo termico della reazione è mostrato nella tabella 2.

Tabella 2: ciclo termico della reazione di Real Time PCR

Fase	Temperatura	Tempo	N° cicli
Attivazione UNG (Uracil DNA glicosilasi)	50° C	2 min	1
Denaturazione iniziale	95° C	10 min	40
Denaturazione	95° C	15 sec	
Annealing + Estensione	62° C	60 sec	

I campioni utilizzati come “standard” sono stati analizzati in triplice copia, mentre tutti gli altri in duplice copia.

Al termine della reazione il software dello strumento procedeva alla costruzione della curva standard e alla elaborazione quantitativa dei dati ottenuti sulle mozzarelle di bufala artificialmente contaminate da latte bovino. Sono state effettuate 5 diverse reazioni di Real Time PCR per ogni livello di contaminazione scelto per verificarne la ripetibilità e calcolarne l'errore percentuale

Campioni commerciali – 15 mozzarelle di bufala campana D.O.P. in commercio sono state analizzate secondo le procedure del metodo.

RISULTATI

I risultati relativi alle mozzarelle artificialmente contaminate sono riassunti nella tabella 3 (i risultati sono rappresentativi delle medie dei valori ottenuti dalle singole copie).

Tabella 3: risultati quantitativi sulle mozzarelle home-made

	50%	20%	8%	5%	2%
Real Time 1	27,06	13,23	/	6,22	/
Real Time 2	32,4	14,9	/	6,08	/
Real Time 3	25,89	15,27	/	6,51	/
Real Time 4	39,8	17,87	/	5,5	/
Real Time 5	29,86	14	/	5,13	/
Real Time 6	/	/	5,69	6,89	2,98
Real Time 7	/	/	9,16	3,76	1,35
Real Time 8	/	/	9,26	3,25	1,34
Real Time 9	/	/	9,8	2,97	1,56
Real Time 10	/	/	6,73	4,11	2,32

I valori delle slope (pendenza della retta di interpolazione) relative alle curve standard, per ogni reazione di Real Time PCR, sono i seguenti (tabella 4):

Tabella 4: slope calcolati delle curve standard

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Slope	3,6	3,6	3,7	4	3,5	4,5*	3,6	3,2	3,3	3,4
	Media = 3,68					Media = 3,4				

*: valore non considerato nel calcolo della media

I valori di R^2 delle curve standard sono compresi fra 0,96 e 0,99.

Alla luce dei risultati mostrati in tabella 3 sono state calcolate le rispettive medie e deviazioni standard per ogni livello di contaminazione, come mostrato in tabella 5.

Tabella 5: medie e deviazioni standard dei risultati sperimentali

	50%	20%	8%	5%	2%
Media \pm dev. Std.	31 \pm 5,5	15 \pm 1,7	8,1 \pm 1,8	5 \pm 1,4	1,9 \pm 0,7

In tutte e 10 le prove di Real Time PCR il controllo negativo di processo è risultato essere effettivamente negativo.

Nei campioni commerciali sono state rilevate tracce di DNA bovino a concentrazioni calcolate inferiori allo 0,01% in 10 casi, totale assenza in 4 casi, mentre in un caso la percentuale misurata si attestava sul 15%.

DISCUSSIONE

I dati risultati dalle prove effettuate sui campioni preparati in laboratorio dimostrano che la metodica in Real Time PCR può essere uno strumento validissimo per individuare e quantificare la presenza di contaminanti di origine bovina nelle mozzarelle di bufala.

I valori ricavati sperimentalmente relativi alle percentuali del 50% e 20% sono sottostimati rispetto ai valori attesi, mentre per quanto riguarda gli altri livelli di contaminazione più bassa la correlazione è buona (tabella 5). Questa disomogeneità non impedisce al metodo di discriminare comunque i campioni in base ai diversi livelli di contaminazione e, soprattutto, di poter separare alte e basse dosi di latte bovino in latte bufalino (tabella 3). Infatti, ad esempio, la presenza di 20% di latte vaccino non è mai stata erroneamente misurata al di sotto del valore del punto inferiore della curva standard.

La sottostima rilevata nelle alte dosi di contaminazione può essere dovuta o ad una minore efficienza di estrazione del DNA totale dalle mozzarelle in esame, con conseguente minore quantità di DNA bovino nell'estratto, oppure da una resa inferiore del latte bovino nella formazione della cagliata, con maggiore “dispersione” di materiale genetico target nel siero. Per questo è necessario verificare il metodo partendo da nuove cagliate e misurare la quantità di DNA bovino eventualmente presente nel siero.

La specificità del metodo è buona in quanto la mozzarella di puro latte bufalino è sempre risultata negativa. Le curve standard costruite hanno una slope (valore di riferimento 3,3) che garantisce un calcolo preciso della quantità di DNA presente nel campione amplificato (tabella 4).

Per aumentare la precisione del metodo occorre normalizzare i dati forniti dallo strumento sulla quantità effettiva di DNA estratto dal campione, che può variare nonostante la matrice sia sempre la stessa ed il protocollo di estrazione utilizzato sia un kit standardizzato. Per fare ciò è necessario avere a disposizione una coppia di primer in grado di appaiarsi sia a DNA bovino che bufalino con la stessa efficienza. Ulteriori prove sono attualmente in corso utilizzando l'intercalante SYBR Green come fluoroforo per verificare le differenze relative, in contenuto di DNA totale, di ogni singolo campione per poi procedere con la normalizzazione finale del valore di DNA bovino ottenuto.

BIBLIOGRAFIA

1. Bottero MT., Civera T., Anastasio A., Turi RM., Rosati S., 2002 "Identification of cow's milk in buffalo cheese by duplex polymerase chain reaction" *Journal of Food Protection*. 65(2): 362-6.
2. Branciari R., Nijman I., Plas J., Di Antonio E., Lenstra A., 2000 "Species origin of milk in Italian mozzarella and Greek feta cheese" *Journal of Food Protection*, 63: 408-411.
3. Commission Regulation (EC) n° 213/2001 of the Commission of 9th January XV, Reference method for the detection of cows' milk and caseinate in cheeses from ewes' milk, goats' milk or buffalos' milk or mixtures of ewes' and buffalos' milk. Official Journal of the European Commission, February 7, 2001, pp 0001-0099.
4. Dalmasso A., Civera T., La Neve F., Bottero MT. 2011, "Simultaneous detection of cow and buffalo milk in mozzarella cheese by Real Time PCR assay" *Food Chemistry* 124, 362-366.
5. Enne G., Elez D., Fondrini F., Bonizzi I., Feligini M., Oleandri R. 2005, "High-performance liquid chromatography of governing liquid to detect illegal bovine milk's addition in water-buffalo mozzarella: comparison with results from raw milk and cheese matrix" *Journal of Chromatography*, 1094, 169-174.
6. Hurley I.P., Ireland H.E., Coleman R.C., Williams J.H.H. 2004 "Application of immunological methods for the detection of species adulteration in dairy products. *International Journal of Food and Science Technology*, 39, 873-878.
7. Maccabiani G., Pavoni E., Tilola M., Agnelli E., Bertasi B., M.N. Losio, Boni P. 2005 "Messa a punto di una metodica di PCR per l'identificazione di specie in latte e derivati" *Industrie Alimentari – XLIV* (2005) Aprile N° 446: 363-67
8. Rea S., Chikuni K., Branciari R., Sangamayya RS., Ranucci D., Avellini P. 2001 "Use of duplex polymerase chain reaction (duplex PCR) technique to identify bovine and water buffalo milk used in making mozzarella cheese" *Journal of Dairy Research* 68(4): 689-698.

SVILUPPO DI UN METODO MOLECOLARE PER LA RICERCA DI *Escherichia coli* O104:H4 PRODUTTORE DI VEROCITOTOSSINA (VTEC O104) NEGLI ALIMENTI

Michelacci V., Morabito S., Tozzoli R., Grande L., Scavia G., Ferreri C., Minelli F., Marziano M. L., Caprioli A.

Laboratorio Europeo e Nazionale di Riferimento per *Escherichia coli*, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia

Keywords: *Escherichia coli*, VTEC O104:H4, PCR-Real Time

ABSTRACT

A large outbreak of haemolytic uraemic syndrome and bloody diarrhoea has occurred in Europe in May and June 2011. The causative agent was an unusual verocytotoxin-producing *Escherichia coli* strain, belonging to serotype O104:H4 and lacking the *eae* gene, which is considered a hallmark of highly pathogenic VTEC. As an early response to the emergency, the European Union Reference Laboratory for *E. coli* developed a Real Time-PCR based method for the detection of the O104:H4 outbreak strain in foodstuff. Such a method allows the identification of negative and presumptively positive samples in 24 hours and requires further 24 hours for strain isolation and confirmation. The proposed method represents an important tool for the fast and specific detection of this rare and unusual VTEC strain in foodstuff.

INTRODUZIONE

Durante i mesi di Maggio e Giugno 2011 si è verificata in Germania una gravissima epidemia di diarrea emorragica e sindrome emolitica uremica (SEU), una complicanza delle infezioni intestinali da *Escherichia coli* produttore di verocitotossina (VTEC) caratterizzata da un'insufficienza renale acuta che spesso necessita di dialisi. Nel corso dell'epidemia sono stati registrati 4033 casi, di cui 901 casi di SEU e 50 morti (3). Il ceppo responsabile dell'epidemia era uno stirpe VTEC appartenente ad un sierotipo inusuale, O104:H4 (6), raramente associato a malattia nell'uomo, e l'origine del focolaio epidemico è stata individuata nel consumo di germogli vegetali crudi contaminati. Nel mese di Giugno un altro focolaio di infezione causato dallo stesso ceppo VTEC è stato identificato in Francia (3).

La caratterizzazione molecolare del ceppo epidemico ha rilevato la presenza del gene *vtx2*, che codifica per la verocitotossina di tipo 2, e l'assenza del gene *eae*, marcatore genetico del meccanismo "attaching-effacing" di adesione alla mucosa intestinale, considerato un carattere distintivo dei ceppi VTEC altamente patogeni per l'uomo. Sorprendentemente, il ceppo possedeva invece geni caratteristici degli *E. coli* enteroaggregativi, che rappresentano un diverso patogruppo di *E. coli* e sono capaci di colonizzare la mucosa intestinale attraverso un diverso meccanismo di adesione rispetto ai VTEC. Il ceppo epidemico era inoltre resistente ad una vasta gamma di antibiotici (resistenza ad ampicillina, cefoxitina, cefotaxima, cefazidime, streptomina, tetraciclina, trimetoprim/sulfametossazolo ed acido nalidixico) ed era in grado di produrre beta-lattamasi ad ampio spettro (ESBL) (1).

Le particolari caratteristiche del ceppo VTEC O104 hanno inizialmente complicato l'analisi dei campioni di alimenti svolte durante le indagini epidemiologiche nel corso dell'epidemia. Gli unici standard disponibili per la ricerca dei VTEC negli alimenti sono costituiti da un metodo colturale per la ricerca di VTEC O157 (ISO 16654:2001) ed un metodo molecolare di recente formulazione per la ricerca di VTEC appartenenti ai sierogruppi più frequentemente associati a malattia (O157, O26, O103, O111 ed O145), che si basa sull'identificazione dei geni codificanti le verocitotossine (*vtx*), del gene *eae* e dei geni associati a tali

sierogruppi (CEN ISO TS 13136, in fase di pubblicazione). Entrambi questi metodi non erano utilizzabili per la ricerca negli alimenti del ceppo VTEC O104:H4 responsabile dell'epidemia. Il nostro laboratorio, in qualità di Laboratorio di Riferimento per l'Unione Europea per *E. coli* (EU-RL), ha rapidamente sviluppato un metodo molecolare basato sulla tecnica della PCR-RealTime, in grado di identificare la presenza presuntiva del ceppo epidemico in campioni di alimenti in 24 ore. Ulteriori 24 ore sono richieste per l'isolamento e la conferma dei ceppi isolati (4). Il metodo è stato diffuso attraverso il sito internet dell'EU-RL già il 27 Maggio, cinque giorni dopo la prima comunicazione delle autorità tedesche dell'esistenza dell'epidemia. Questo ha fornito alla rete europea e nazionale dei laboratori deputati al controllo degli alimenti uno strumento analitico per fronteggiare l'emergenza.

DISEGNO DEL METODO

Al fine di elaborare un metodo rapido ed efficace per la ricerca del ceppo VTEC O104:H4 negli alimenti, abbiamo messo a punto una procedura che mira all'identificazione del gene associato all'antigene O104 (*wzx_{O104}*) in colture di arricchimento positive per la presenza dei geni codificanti le verocitotossine (*vtx*).

Il primo step del metodo consiste nella preparazione di colture di arricchimento mediante aggiunta di 25 g dell'alimento da testare (25 ml nel caso si tratti di alimenti liquidi) a 225 ml di acqua peptonata, che vengono successivamente omogeneizzati e lasciati in incubazione a 37°C ± 1°C per 18-24 ore. Nel caso di analisi di campioni di semi, la probabile fonte di infezione dell'epidemia da VTEC O104:H4, la porzione da saggiare è invece di 50 g (4). Un'aliquota di 1 ml della coltura di arricchimento viene quindi analizzata per la presenza dei geni codificanti le verocitotossine mediante PCR-RealTime secondo quanto descritto nel primo passaggio del metodo standard CEN ISO TS 13136. I campioni che risultano *vtx*-positivi vengono quindi sottoposti a PCR-RealTime per l'identificazione del gene *wzx_{O104}* (Tab. 1) (2).

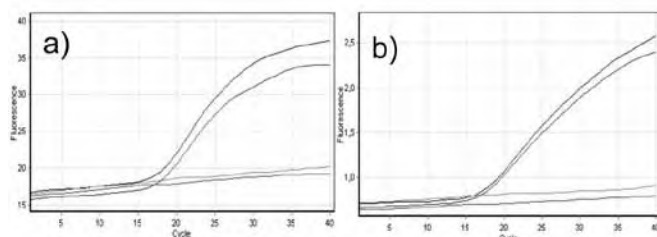
Tabella 1. Primers e sonde utilizzati nel metodo descritto

Nome	Sequenza	Gene	Prodotto	Acc. No.	Rif
<i>wzx_{O104}</i> fwd	TGTCGCGCAAA GAATTTC AAC	<i>wzx_{O104}</i>	100 bp	CU 928 145	2
<i>wzx_{O104}</i> rev	AAAATCCTTTAAA CTATACGCC				
<i>wzx_{O104}</i> probe	TTGGTTTTTTGT ATTAGCAATAAGT GGTGTC				
<i>fliC_{H4}</i> fwd	GCTGGGGGTAAA CAAGTCAA	<i>fliC_{H4}</i>	192 bp	AY2 499 89	4
<i>fliC_{H4}</i> rev	CCAGTGCTTTTAA CGGATCG				
<i>fliC_{H4}</i> probe	TCTTACACTGACA CCGCGTC				

I campioni positivi ad entrambi i saggi ($vtx+$, $wzx_{O104}+$) vengono quindi seminati su piastre di MacConkey agar o TBX allo scopo di isolare singole colonie. Si può scegliere di utilizzare anche un ulteriore terreno selettivo addizionato di uno degli antibiotici per i quali il ceppo mostra resistenza. Un massimo di 50 colonie che mostrano la tipica morfologia degli *E. coli* o che crescono su piastre selettive vengono seminate su piastre di Nutrient Agar (NA) e contemporaneamente saggiate (singolarmente o in pool da 10 colonie ciascuno) per la presenza dei geni vtx . Le colonie positive a tale saggio vengono testate ulteriormente per la presenza del gene associato all'antigene O104 e del gene $fliC_{H4}$ (tab. 1), che codifica l'antigene flagellare H4. Una coppia di primers ed una sonda specifiche sono state sviluppate nel nostro laboratorio sulla base della sequenza del gene $fliC_{H4}$ del ceppo di *E. coli* U9-41, disponibile in banca dati con il numero d'accesso AY249989 (Tab.1).

Le due reazioni di PCR-RealTime per i geni wzx_{O104} e $fliC_{H4}$ possono essere anche eseguite contemporaneamente in duplex, mediante marcatura delle due sonde molecolari con fluorofori compatibili (ad esempio FAM ed HEX). Un esempio dei risultati ottenuti con una reazione duplex è mostrato in figura 1.

Figura 1. Curve di amplificazione relative ad una reazione di PCR-RealTime per wzx_{O104} e $fliC_{H4}$ eseguita in duplex: curve di amplificazione di un campione positivo e di un controllo negativo per i geni wzx_{O104} (a) e $fliC_{H4}$ (b)



In alternativa, la conferma delle colonie isolate può essere effettuata mediante il protocollo di PCR convenzionale sviluppato dal "Konsiliarlabor für Hämolytisch-Urämisches Syndrom (HUS)", che consiste in una reazione di PCR convenzionale multiplex che ha come target geni caratteristici del ceppo epidemico vtx , $TerD$, rfb_{O104} and $fliC_{H4}$ (5) inserito nella procedura come annesso (4).

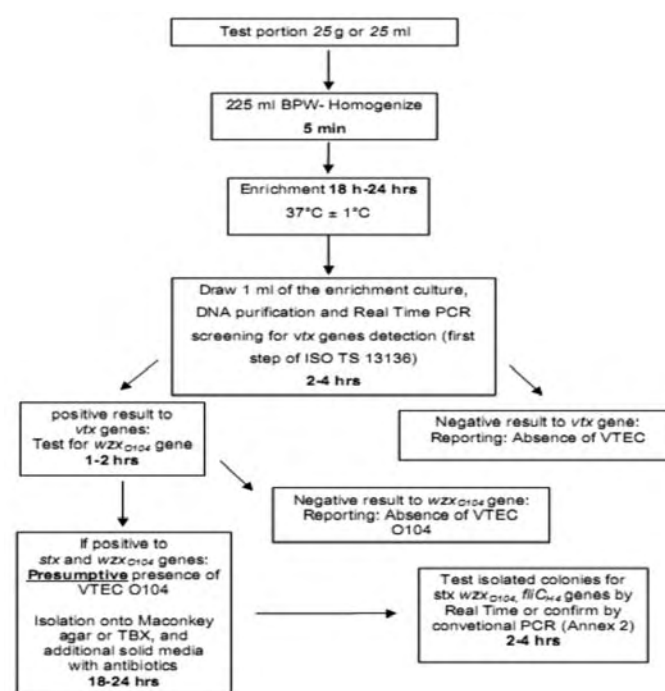
DISCUSSIONE

Il ceppo VTEC responsabile dell'epidemia sviluppatasi in Germania nei mesi di Maggio-Giugno 2011 appartiene ad un sierotipo raramente associato in precedenza a malattia grave nell'uomo e possiede un'inusuale combinazione di determinanti genetici di virulenza (1, 6). Queste caratteristiche fanno sì che i metodi standard ad oggi disponibili per la ricerca dei VTEC, essendo basati sull'identificazione di queste caratteristiche, non siano efficaci per identificarne la presenza. D'altra parte, la ricerca di tale ceppo negli alimenti è risultata immediatamente un aspetto di enorme importanza per identificare la fonte dell'epidemia e rassicurare la popolazione, visto l'enorme impatto emotivo dell'episodio sulla popolazione europea. Per questo motivo, il nostro laboratorio, in qualità di Laboratorio di Riferimento per l'Unione Europea per gli *E. coli* patogeni, ha sviluppato e divulgato rapidamente (dopo cinque giorni dalla comunicazione che l'epidemia era in corso) attraverso il proprio sito internet (www.iss.it/vtec) un metodo molecolare in grado di identificare la presenza del ceppo VTEC O104:H4 (4)

(Figura 2). Tale metodo si basa sulla ricerca dei geni wzx_{O104} , che codifica l'antigene superficiale O104, e $fliC_{H4}$, codificante invece l'antigene flagellare H4, in colture di arricchimento positive per la presenza dei geni vtx .

Questo metodo permette di escludere in sole 24 ore la contaminazione dei campioni da parte del ceppo VTEC O104:H4 o di identificarne la presenza presuntiva qualora le PCR-RealTime che hanno come target i geni vtx e wzx_{O104} risultino positive. In tal caso, si rende necessario uno step di isolamento su piastra seguito da conferma delle colonie isolate quali VTEC O104:H4 mediante PCR-RealTime o PCR convenzionale. L'identificazione dei campioni positivi e l'isolamento del ceppo VTEC O104:H4 richiede quindi un tempo totale massimo di 48 ore (Figura 2).

Figura 2. Diagramma di flusso della procedura di screening degli alimenti



Questo metodo rappresenta un utile strumento per l'identificazione di ceppi VTEC O104:H4 in campioni di alimenti e grazie alla sua rapidità di esecuzione, si è rilevato di grande utilità nel corso delle analisi svolte durante l'epidemia e resta ad oggi la metodica d'elezione per la ricerca di VTEC O104:H4 negli alimenti.

BIBLIOGRAFIA

1. Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Köck R, Fruth A, Bauwens A, Peters G, Karch H. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect Dis*. 2011 Sep;11(9):671-6.
2. Bugarel M, Beutin L, Martin A, Gill A, Fach P. Micro-array for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) seropathotypes associated with Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome in humans. *Int J Food Microbiol*. 2010 Sep 1;142(3):318-29.
3. European Centre for Disease Prevention and Control,

- Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC): Update on outbreak in the EU, 27 July 2011
4. European Reference Laboratory for *E. coli*. Detection and identification of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) O104:H4 in food by real Time PCR. Rome: Istituto Superiore di Sanità; 2 Jun 2011. Available from: http://www.iss.it/binary/vtec/cont/Lab_Proc_VTEC_O104.pdf
 5. Konsiliarlabor für Hämolytisch-Urämisches Syndrom (HUS), "Laborinfo Stand 01.06.2011" downloadable from the website www.ehec.org.
 6. Scheutz F, Nielsen EM, Frimodt-Møller J, Boisen N, Morabito S, Tozzoli R, Nataro JP, Caprioli A.. Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. *Euro Surveill.* 2011 Jun 16;16(24). pii: 19889.

SENSORI ELETTROCHIMICI A DNA PER LO SCREENING DI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI

Lanzone V.*, Del Carlo M.*, Compagnone D.*, Galiero G.***, De Roma A.***, Corrado F.***

*Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università degli Studi di Teramo

** Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno

Keywords: biosensore a DNA, IPA, nanoparticelle d'oro

SUMMARY

We developed a DNA biosensor based on gold nanoparticles for detection of ubiquitous contaminants such as Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). The assay is based on inhibition of the hybridization reaction between two complementary sequences following the formation of a stable adduct of DNA and submicromolar concentrations of the contaminant B[a]PDE (1). All the compounds forming stable adducts with DNA can be detected and, therefore, the assay could be used as a screening test for genotoxicity of PAHs, their oxidation products and other synthetic compounds.

INTRODUZIONE

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) sono contaminanti formanti, generalmente, nei processi di combustione di origine antropogenica, soprattutto in condizioni di carenza di ossigeno. La catena alimentare rappresenta la principale fonte di esposizione per l'uomo a tali sostanze che, per la loro natura idrofobica, si accumulano principalmente nei tessuti adiposi. Alcuni di essi sono in grado di legare il DNA attraverso la formazione di addotti con conseguenti effetti genotossici e cancerogenici. Tali effetti sono associati all'attivazione metabolica di intermedi diol-epossidici più reattivi dei composti di partenza. Attualmente, per la rivelazione degli IPA negli alimenti vengono utilizzate le tecniche separative quali l'HPLC con rivelatore a fluorescenza (FLD) e la gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS). Tali tecniche permettono di raggiungere dei bassi limiti di rivelazione ma richiedono lunghi tempi di analisi, procedure complesse per la preparazione del campione nonché una strumentazione sofisticata e molto costosa. Per questo motivo, è stata rivolta una crescente attenzione alla possibilità di utilizzo dei biosensori a DNA, dispositivi analitici sensibili, selettivi, con tempi di risposta rapidi, producibili su larga scala e a basso costo. In questo lavoro è stato sviluppato un biosensore elettrochimico a DNA basato sull'utilizzo di nanoparticelle d'oro come materiale di supporto per l'immobilizzazione del materiale biologico e un metodo di rivelazione indiretto amplificato per via enzimatica per la rivelazione degli addotti tra il DNA e il B[a]PDE, principale metabolita attivo del B[a]P.

MATERIALI E METODI

Le sequenze oligonucleotidiche funzionalizzate con il gruppo esantiolo, fornite da Invitrogen, sono: sequenza contenente gli hot spot (HS) [ThiC6]-TTTCGTCAAAGGCGG TCTGTCATA, sequenza random (NO HS) [ThiC6]-CTC ACTCAACACTCATTAGCGACA e sequenza che non contiene adenine e guanine (NO GA) bersagli del B[a]PDE, [ThiC6]-TTTCTCTTCTTCTCTCTCCCCCTC. Le rispettive sequenze complementari biotinilate sono: complementare HS (5'-biot-TATGACAGACCGCCTTTGACGAAA), NO HS (5'-biot-TGTCGCTAATGAGTGTTGAGTGAG) e NO GA (5'-biot-GAGGGGGAGAGAGAAGAAGAG). Gli screen printed d'oro

(SPGE) e di grafite (SPCE) sono forniti da EcoBioServices & Researches. Le nanoparticelle d'oro sono state preparate con il metodo Frens (2) e successivamente funzionalizzate attraverso l'immobilizzazione sulla superficie delle sequenze oligonucleotidiche per la formazione dei moduli di affinità (3). Tutti i reagenti utilizzati sono forniti da Sigma Aldrich.

-Principio del saggio

Le sequenze oligonucleotidiche funzionalizzate con il gruppo esantiolo in posizione 5' (probe) sono immobilizzate sulla superficie d'oro del sistema di trasduzione ed incubate con le rispettive sequenze complementari funzionalizzate all'estremità 5' con la biotina. Una volta avvenuta la reazione di ibridazione tra le due sonde complementari si aggiunge l'enzima alcalin-fosfatasi coniugato con la streptavidina in maniera tale da sfruttare l'interazione altamente specifica biotina-streptavidina per introdurre il marcatore enzimatico nel sistema. L'enzima catalizza la reazione di idrolisi del substrato con la formazione di un prodotto che genera un segnale analitico la cui intensità è correlabile alla percentuale di duplex formato. La rilevazione del B[a]PDE si basa sull'inibizione della reazione di ibridazione tra le due sequenze complementari. L'aggiunta del tossico, infatti, e la conseguente formazione dell'addotto, comporta un impedimento della reazione di ibridazione determinando in tal modo, una diminuzione della quantità di enzima che si lega al sistema e del prodotto formato. Si osserva, quindi, una riduzione dell'intensità del segnale analitico direttamente proporzionale alla quantità di tossico aggiunto (4).

-Biosensore elettrochimico a DNA con elettrodi screen printed d'oro (SPGE)

Il protocollo per la realizzazione del biosensore a DNA su elettrodi SPGE prevede 19 h di incubazione con 6 µL di probe tiolato 5µM in PBS (tampone fosfato di sodio dibasico 0,5 M a pH 8,5) per l'immobilizzazione del materiale biologico. Segue il lavaggio con alcune gocce di acqua distillata e il bloccaggio dei siti liberi con 6-mercapto-1-esanolo 1mM per 3h a T ambiente. Si procede con la deposizione di 6µL di target biotinilato complementare, 5 µM in tampone citrato sodico SSC 2X (NaCl 300 mM, C6H5Na3O7 30 mM a pH 7,4) per 20min a temperatura ambiente e 6µL di enzima streptavidina-alcalin fosfatasi in tampone DEA (dietanolammina 0,1 M, MgCl2 1mM, KCl 10mM pH 9.6) per 20 min a temperatura ambiente. Successivamente si aggiunge il substrato enzimatico, 1-naftil fosfato 1mg/mL in DEA 100µL per 10min. Una volta formato il prodotto si esegue la misura in voltammetria differenziale ad impulsi (DPV) nel range di potenziale compreso tra +0V a +0,6V con uno strumento AUTOLAB PGSTAT 12, con software GPES (Eco Chemie), a temperatura ambiente. Tra una fase di incubazione e la successiva la superficie degli elettrodi viene lavata con tampone DEA con 0,1% di TWEEN 20 (200µL per 3 volte) per eliminare i reagenti in eccesso.

-Biosensore elettrochimico a DNA basato sui moduli di affinità. In omogeneo, il protocollo prevede la deposizione semplice dei moduli di affinità sulla superficie degli elettrodi screen printed

di grafite, pretrattati con 100 μL di fosfato 0,1 M a pH 7,0 ed un potenziale costante di 1,7 V per 300s. Segue l'asciugatura in termostato e la polarizzazione con 100 μL di KCl 0,1M ad un potenziale costante (+0,5 V) per 120 secondi. Si prosegue con la deposizione della sonda biotinilata complementare e gli step descritti in precedenza per il biosensore a DNA con gli SPGE. Nel sistema omogeneo tutte le fasi di incubazione e lavaggio vengono condotte all'interno di una eppendorf. Il lavaggio dei reagenti in eccesso viene effettuato mediante l'aggiunta di 500 μL di tampone DEA-TWEEN 20, centrifuga a 12300 rpm ed eliminazione del surnatante (X2). Le temperature vengono controllate mediante l'utilizzo di un termoblocco. L'ibridazione avviene alla temperatura di annealing, in maniera da aumentare la specificità dell'appaiamento delle basi nella formazione del duplex; tutte le altre fasi sono condotte a 30°C.

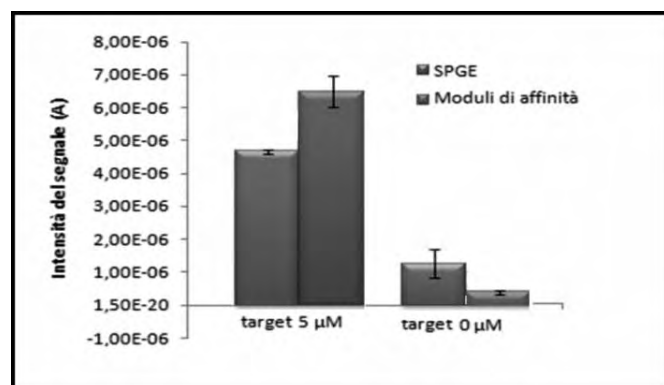
-Sintesi degli addotti DNA-BaPDE:

90 μL di soluzione contenente le sequenze oligonucleotidiche tiolate in tampone Tris-HCl (tris(idrossimetil)amminometano cloridrato pH 7.5) sono incubate con 10 μL di B[a]PDE in THF per 24h a 30°C al buio, per evitare fenomeni di fotodegradazione. Il rapporto tra le concentrazioni finali di sonda e B[a]PDE è 1:5.

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'approccio innovativo adottato per la realizzazione del biosensore elettrochimico a DNA ha previsto, nella prima fase, l'utilizzo degli elettrodi SPGE come sistema di trasduzione del segnale analitico, con l'immobilizzazione della sequenza oligonucleotidica sulla superficie piana dell'elettrodo di lavoro in oro. Il confronto tra le intensità dei segnali ottenuti in presenza del target biotinilato, alla concentrazione ottimizzata, e in assenza (bianco), evidenziano un elevato adsorbimento aspecifico dell'enzima sulla superficie dell'elettrodo con un rapporto segnale/rumore pari a 4. Per ovviare alla scarsa sensibilità del sistema di rivelazione, alla luce dei recenti progressi nel campo delle nanotecnologie, si è pensato di sfruttare le peculiari proprietà dei materiali nanostrutturati ed, in particolare l'elevato rapporto superficie/volume, per l'immobilizzazione delle sequenze oligonucleotidiche. In questo modo, infatti, è stato possibile ottenere un aumento della superficie disponibile per il legame con la sonda tiolata, con un incremento della sensibilità del sistema ed una concomitante riduzione del segnale di adsorbimento aspecifico (figura 1).

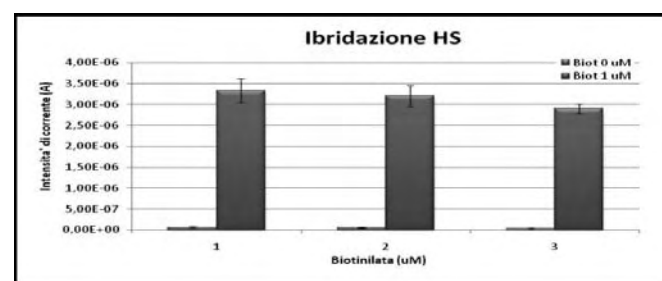
Figura1: Confronto segnale di ibridazione (target 5 μM) e segnale aspecifico (target 0 μM) ottenuto con gli SPGE (blu) e i moduli di affinità (rosso)



L'utilizzo dei moduli di affinità con la metodica in eterogeneo, analoga a quella adottata per la realizzazione del biosensore con gli SPGE, ha consentito, quindi, di ottenere un miglioramento

della sensibilità del sistema di analisi. Tuttavia, il segnale risultava comunque scarsamente riproducibile ($\text{CV} > 20\%$) e non confrontabile in giorni differenti, probabilmente a causa del mancato controllo dei parametri sperimentali, in particolare della temperatura. La necessità di superare tali limiti del dispositivo di analisi ha portato ad un approccio differente (sistema omogeneo), in cui tutte le fasi di incubazione e di lavaggio sono condotte all'interno di una eppendorf. In questo modo è stato possibile sia controllare la temperatura, grazie all'utilizzo di un termoblocco, che diminuire i tempi necessari per la reazione di ibridazione, essendo la cinetica di reazione favorita rispetto al sistema eterogeneo. I risultati ottenuti con questo nuovo approccio evidenziano come il maggior controllo dei parametri sperimentali e il superamento della variabilità legata all'utilizzo degli SPCE, portino ad un notevole miglioramento nella riproducibilità intra ed inter-day (figura 2).

Figura 2: confronto tra prove di ibridazione con i moduli HS condotte in 3 giorni differenti



Una volta ottimizzate le condizioni per la reazione di ibridazione, sono state effettuate le prove preliminari di inibizione con il B[a]PDE nell'approccio omogeneo. I risultati ottenuti non evidenziano differenze significative di segnale tra il bianco in assenza dell'analita e in presenza dello stesso (dati non riportati) il che evidenzia la necessità di ulteriori ottimizzazioni sia per le condizioni di preparazione degli addotti sia per la reazione di inibizione.

Gli sviluppi futuri di questo lavoro prevedono l'ottimizzazione del biosensore al fine di ottenere un valido dispositivo per l'analisi di IPA in soluzioni standard e successivamente come test di screening per studi di genotossicità in campioni reali.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Rodin S.N., Rodin A.S., (2002), *On the origin of p53 G:C→T:A transversions in lung cancers*, Mutation Research, 508, pp. 1–19.
- 2) Frens. G., (1973), *Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions*, Nature Phys. Sci. 241: pp. 20-22.
- 3) Moreno M., Rincon E., Pérez J. M., González V.M., Domingo A., Dominguez E., (2009), *Selective immobilization of oligonucleotide-modified gold nanoparticles by electrodeposition on screen-printed electrodes*, Biosensors and Bioelectronics, 25, pp. 778–783.
- 4) Pontén I., Kim S. K., Gräslund A., Nordén B., Jernström B., (1994), *Spectroscopic studies of the trans adducts derived from (+)-and(-)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide and the oligonucleotide 5'-d(CCTATAGATATCC)*, Carcinogenesis.15(10):2207-13.

IMPIEGO DI JOHNINA SPERIMENTALE NEL GAMMA-INTERFERON TEST IN BOVINI INFETTI DA *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: DATI PRELIMINARI

**Mazzone P.¹, Vitale N.², Ricchi M.³, Corneli S.¹, Mangili P. M.¹, Papa P.¹, Caporali A.¹, Biagetti M.¹,
Checcarelli S.¹, Ciullo M.¹, Gradi M.¹, Guglielmi F.¹, Fumanti P.¹, Benedetti F.¹, Raber A.⁴, Arrigoni N.³ e Cagiola M.¹**

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta

³Centro di Referenza Nazionale per la Paratubercolosi - Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna

⁴Prionics AG Switzerland

Key words: paratubercolosi bovina, γ -IFN test, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*

SUMMARY

The main mycobacterial diseases affecting cattle are bovine Tuberculosis (bTB), due to *Mycobacterium bovis* and bovine Paratuberculosis (PTBC), caused by *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Ante-mortem diagnosis of bTB relies on tests that measure the cell-mediated response (skin test and gamma interferon test). Unfortunately, the performance of these tests may be significantly affected by previous exposure to MAP. The diagnosis of PTBC is usually based on serology and faecal culture, which detect advanced stages of infections. The development of an immunological test that, at the same time, can distinguish between animals infected with *M. bovis* or MAP and enables an early diagnosis of PTBC, could support the control of both diseases. To improve the analytic performances of γ -IFN test, 3 purified protein derivatives (PPD) of MAP (Johnin) were produced, in order to stimulate lymphocytes, in association with the classic avian and bovine PPDs. In this preliminary study, our Johnin seems to be useful to highlight PTBC infected animals, avoiding false positive reaction for bTB.

INTRODUZIONE

Il test del γ -interferon (γ -IFN) in affiancamento alla prova intradermica (IDT), viene utilizzato in molti paesi europei nella diagnosi della Tubercolosi Bovina (bTB). Tale metodica rileva la quantità di citochina prodotta dai linfociti T degli animali infetti, in risposta ad una stimolazione effettuata con gli antigeni tubercolari (1). La valutazione immunologica per individuare animali infetti da *Mycobacterium bovis* (MB) risulta spesso complicata da reazioni crociate che si osservano negli animali esposti ad altre specie di micobatteri, in particolare *Mycobacterium avium* subsp. *avium* (MAA) e *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) agente responsabile della Paratubercolosi bovina (PTBC). Gli antigeni normalmente impiegati nella fase di stimolazione dei linfociti prevista nel γ -IFN test sono le tradizionali tubercoline bovina e aviaria, derivati proteici purificati estratti rispettivamente da MB (PPDB) e da MA (PPDA). La Johnina (PPDJ), analogamente alle tubercoline, è un derivato proteico purificato ottenuto da una coltura in terreno liquido sintetico di MAP, mediante precipitazione con acido tricloroacetico (TCA), lavaggio del precipitato e sua dissoluzione in tampone fosfato fenolato e glicerina in opportuna concentrazione (2).

Nel presente studio sono state prodotte e valutate tre diverse Johnine sperimentali (PPDJ) ottenute da colture di 2 ceppi di MAP di campo ed il ceppo MAP ATCC 19698. Le tre PPDJ sperimentali sono state utilizzate, in affiancamento alle PPDB e PPDA, nella fase di stimolazione linfocitaria del test γ -IFN, per verificare l'efficacia del loro impiego nell'evidenziare correttamente l'infezione paratubercolare senza rilevare false positività alla bTB.

MATERIALI E METODI

Sono stati utilizzati nella sperimentazione 24 animali provenienti da 3 allevamenti di bovine da latte, risultati Ufficialmente Indenni (UI) da bTB negli ultimi 6 anni. In tutti gli allevamenti selezionati, nell'ultimo anno, sono stati riscontrati

casi clinici di PTBC, confermati da indagini sierologiche e accertamenti post-mortem. Gli animali sono stati sottoposti in parallelo a:

- Test ELISA per PTBC "ID Screen® paratuberculosis Indiretto" (IDVet Innovative Diagnostics, Montpellier-France) da siero di sangue.
- PCR per la ricerca diretta di MAP dalle feci. L'estrazione è stata eseguita disciogliendo 1 g di feci in 25 ml di acqua, dopo decantazione per 30 min, sono stati prelevati dal fondo 250 μ l a cui è stato aggiunto 1 ml di ASL buffer (Qiagen buffer ASL stool lysis buffer). Dopo omogeneizzazione in Ribolyzer, il DNA è stato estratto da 200 μ l di omogenato mediante kit commerciale (DNA mini kit blood and body fluid Qiagen). L'amplificazione è stata effettuata con una Nested PCR (3).

Sono stati considerati positivi per PTBC i soggetti in cui è stato evidenziato esito positivo in almeno uno dei due test (ELISA e/o PCR).

Allestimento Johnine: Presso il Centro di Referenza Nazionale per la PTBC, 20 ceppi di campo di MAP, candidati ad essere utilizzati per la produzione dei lotti di PPDJ, sono stati genotipizzati mediante amplificazione di loci minisatelliti e micro satelliti (4). Sono stati selezionati 2 ceppi di campo: ceppo A che presenta il profilo genetico più frequente in Italia; ceppo B che invece rappresenta un profilo genetico raro nel territorio nazionale. Nella fase di allestimento della PPDJ, oltre ai ceppi A e B, è stato utilizzato il ceppo ATCC 19698. I tre ceppi di MAP sono stati coltivati in terreno liquido Watson-Reid (WR) modificato, per 60 giorni a 37°C per ottenere la coltura primaria. I passaggi successivi delle colture sono stati effettuati in bottiglie Roux contenenti 500 ml di WR modificato, incubate per 4 mesi a 37°C. L'estratto proteico è stato ottenuto utilizzando il protocollo in uso presso l'IZSUM per la produzione delle PPD Bovina e Aviaria (D.M. 26 giugno 1981). Il valore in azoto proteico delle PPDJ sperimentali è stato determinato con metodo Kjeldahl (proteine = $6 \cdot 25 \times N$). Il titolo finale è stato portato a 1 mg / ml mediante l'aggiunta di un diluente contenente 10% di glicerina, 0,5% di fenolo e 0,5 di NaCl in tampone fosfato M/30.

Stimolazione in vitro e Test ELISA per γ -IFN: I campioni di sangue eparinizzato dei 24 soggetti, sono stati dispensati in aliquote da 1 ml in piastre per colture cellulari e stimolati rispettivamente con:

- "Phosphate Buffered Saline" (PBS 0,01 M, pH 7,2);
- 30 µg di PPDB e 30 µg di PPDA Australiane (di seguito indicate come AA e BA) (AgriQuality Australia Pty Ltd, Victoria, Australia);
- 10 µg di PPDB e 10 µg di PPDA Italiane (di seguito indicate come AI e BI) prodotte presso l'IZSUM;
- Le tre PPDJ (Ceppi A, B, C) con tre diverse diluizioni (1:5, 1:10 e 1:15).

Dopo 24 ore di incubazione, si è proceduto alla raccolta del plasma e la successiva valutazione del γ -IFN è stata eseguita con kit Elisa "M.bovis Gamma Interferon test Kit for Cattle" (BOVIGAM®). I valori ottenuti, espressi in unità di densità ottica (OD) rilevata a 450 nm, sono stati interpretati considerando come positivi valori di OD \geq al doppio dell'OD riscontrata nei pozzetti con solo PBS (2N), secondo lo schema interpretativo in uso presso l'IZSUM (5). Sono state calcolate quindi le differenze tra le OD dei campioni e il rispettivo valore di 2N.

Per valutare il "fattore diluizione" delle Johnine (1:5, 1:10; 1:15) e il "fattore ceppo" (A,B,C) è stata condotta un'analisi della varianza a 2 vie utilizzando la procedura Proc GLM del software SAS® v9.2.

Il confronto tra le medie delle differenze tra la stimolazione con PPDJ ceppo A, B, C e la stimolazione con PPDB Australiane e PPDB Italiane è stato valutato tramite il Test del range di Student di Tukey (HSD) per valori di $p \leq 0,02$.

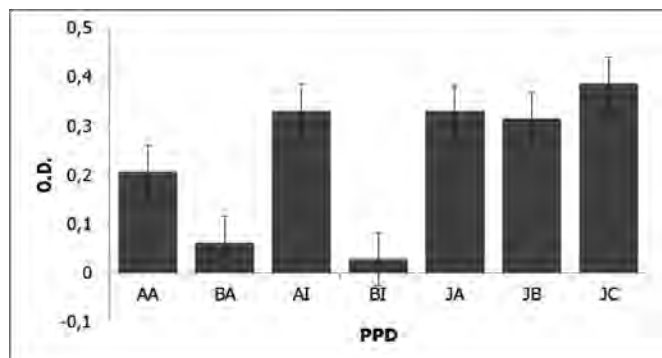
La specificità relativa delle PPDB e delle PPDJ nella diagnosi di bTB (allevamenti UI da bTB) è stata calcolata utilizzando come Gold Standard l'IDT.

La sensibilità relativa delle sole PPDJ nella diagnosi di PTBC (allevamenti infetti da MAP) è stata calcolata utilizzando come Gold Standard la positività in ELISA e/o PCR.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Dei 24 animali indenni da bTB (negativi all'IDT e provenienti da allevamenti UI), 16 sono risultati positivi ad almeno uno dei due test per MAP (ELISA e/o PCR da feci) e 8 sono risultati negativi ad entrambi. I risultati della stimolazione linfocitaria con le diverse PPD e le PPDJ, nei 16 soggetti positivi per PTBC, sono mostrati in Figura 1.

Figura 1: Produzione di γ -IFN nei linfociti stimolati con le diverse PPD e con le tre PPDJ in animali positivi per PTBC (ELISA e/o PCR). I valori sono espressi come Media delle differenze tra l'OD₄₅₀ e il doppio dell'OD₄₅₀ riscontrata con solo PBS \pm Deviazione Standard. AA: PPD Aviare Australiana; BA: PPD Bovina Australiana; AI: PPD Aviare Italiana; BI: PPD Bovina Italiana; JA, JB, JC: Johnine sperimentali allestite rispettivamente con i ceppi di MAP A (ceppo prevalente), B (ceppo raro), C (ATCC)



I risultati dell'analisi della varianza hanno evidenziato una differenza statisticamente significativa tra le medie OD₄₅₀ delle PPDJ sia per il "fattore diluizione" delle Johnine (test F =28.44; $p < 0.0001$), che per il "fattore ceppo" (test F =9.82; $p < 0.0001$). Per quanto riguarda le diluizioni i dati osservati mostrano che la diluizione 1:5 stimola la maggiore produzione di γ -IFN (valore medio di OD₄₅₀ maggiore) per tutte e tre le PPDJ e la differenza è statisticamente significativa. Per quanto riguarda il fattore ceppo, il ceppo B è quello meno potente tra i tre mentre non ci sono differenze statisticamente significative tra ceppo A e ceppo C.

Per quanto riguarda la diagnosi di bTB, lo schema interpretativo utilizzato per evidenziare eventuali reattività per MB (5), prevede l'utilizzo comparativo di PPDA e PPDJ nei confronti di PPDB. I risultati della specificità per bTB sul campione di 24 capi UI da bTB (IDT negativa) mostrano una specificità pari a 100% (IC95: 85-100%) sia prendendo in considerazione le PPDA italiane che le PPDJ sperimentali.

I risultati della sensibilità relativa nella diagnosi di PTBC, delle PPDA Australiane e Italiane e delle PPDJ sono riportati in tabella 1. Le PPDJ ceppi A, B, C riescono a rilevare un elevato numero di soggetti infetti MAP con risultati sovrapponibili.

I dati che emergono dalla sperimentazione, per quanto preliminari, sono perfettamente in linea con quanto evidenziato da altri autori, confermando l'elevata specificità delle PPDA (1,5) e delle Johnine (6) nel non rilevare false positività nei confronti della bTB.

Tabella 1: Valori di sensibilità relativa nella diagnosi di PTBC delle PPD Aviare e delle Johnine sperimentali ceppi A, B e C

PPD	SE	SE IC95%
Aviare Australiana	69%	41-89%
Aviare Italiana	69%	41-89%
Johnina A (1:5)	69%	41-89%
Johnina A (1:10)	63%	35-85%
Johnina B (1:5)	75%	48-93%
Johnina B (1:10)	63%	35-85%
Johnina C (1:5)	69%	41-89%
Johnina C (1:10)	63%	35-85%

La scarsa potenza della Johnina B potrebbe essere legata al basso potere immunogeno del MAP B, nei confronti del quale non esiste memoria immunologica nei soggetti infetti, dal momento che il ceppo è poco rappresentato in Italia. Per quanto riguarda la sensibilità delle PPDJ nell'evidenziare soggetti infetti da MAP, bisogna tener conto che come Gold Standard sono state utilizzate due prove (ELISA e PCR) che rilevano stadi avanzati della malattia. In realtà, poiché la PTBC è una malattia con un lungo periodo d'incubazione, e non è possibile, con le attuali metodiche, evidenziare uno stato precoce di infezione, sarebbe auspicabile nella seconda parte della sperimentazione monitorare gli 8 soggetti identificati come negativi da ELISA e PCR. In tal caso 3 di questi soggetti, considerati come positivi per PTBC dalle PPDJ nel γ -IFN, ma ad oggi ritenuti falsi positivi, potrebbero rivelarsi bovini recentemente infetti in cui le Johnine avevano evidenziato uno stadio precoce dell'infezione da MAP. Pertanto nel futuro il follow up sugli animali e il reclutamento di ulteriori soggetti, permetteranno di sviluppare uno studio longitudinale e di

valutare un possibile utilizzo delle PPDJ nel γ -IFN test per una diagnosi precoce di PTBC.

Sperimentazione realizzata grazie al finanziamento del Ministero della Salute nell'ambito del Progetto di Ricerca Corrente RC IZSUM 11/ 2008.

BIBLIOGRAFIA

1. de la Rúa-Domenech R, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley RS. (2006) Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Sci.* Oct; 81(2):190-210.
2. Ciuchini F., Piccininno G. e Adone R. (1998) Manuale operativo per il controllo di qualità di immunosieri, vaccini e prodotti diagnostici per uso veterinario ISS Rapporti ISTISAN 98/35: 175
3. Millar D, Ford J, Sanderson J, Withey S, Tizard M, Doran T, Hermon-Taylor J. (1996) IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. *Appl Environ Microbiol.* 62(9):3446-52.
4. Ricchi M, Barbieri G, Taddei R, Belletti GL, Carra E, Cammi G, Garbarino CA and Arrigoni N. (2011) Effectiveness of combination of Mini- and Microsatellite loci to sub-type *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Italian type C isolates. *Veterinary Research* *accepted for publication* (August 28th 2011).
5. Mazzone P., Agnetti F., Biagetti M., Cagiola M., Mangili PM., Nardini R., Papa P., Scoccia E., Maresca C. (2010) Infezione da *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* e gamma-interferon test. *Argomenti (Marzo)*: 44-47
6. Kalis C.H.J., Collins M.T., Hesselink J.W., Barkema H.W. (2003) Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay. *Veterinary Microbiology* 97: 73–86.

IFN- γ TEST PER LA DIAGNOSI DI TUBERCOLOSI BOVINA NEL SUINO NERO SICILIANO

Pesciaroli M.¹, Mazzone P.², Marianelli C.¹, Corneli S.², Russo M.³, Aronica V.³, Fiasconaro M.³, Biagetti M.², Ciullo M.², Cagiola M.², Pasquali P.¹ e Di Marco V.³

¹Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

³Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia

Key words: *Mycobacterium bovis*, pig, IFN- γ

SUMMARY

Mycobacterium bovis, the causative agent of bovine tuberculosis (bTB) has a broad host range, that includes also pig. This study evaluated the performances of the IFN- γ assay in detecting *M. bovis* infected pigs and compared the data obtained with the presence of tuberculosis lesions and the findings of *M. bovis* in the microbial cultures. Our preliminary results demonstrate an excellent correspondence between the IFN- γ assay and both *post mortem* diagnostic approaches and indicates the IFN- γ assay as an useful tool for *intra vitam* diagnosis of pig tuberculosis.

INTRODUZIONE

Mycobacterium bovis appartiene al gruppo del *Mycobacterium tuberculosis complex* (MtbC). La peculiarità che lo distingue dagli altri membri di questo gruppo è la capacità di poter infettare una gamma eccezionalmente ampia di animali che comprende specie domestiche, animali selvatici e d'allevamento, come pure gli esseri umani (1). Questa spiccata capacità di adattamento è il fattore principale che rende complessa la situazione epidemiologica della tubercolosi bovina (bTB). Le diverse specie animali sensibili possono rappresentare un vero e proprio "reservoir" dell'infezione oppure semplicemente uno "spillover host" (ospite a fondo cieco). Tra le specie animali recettive al *M. bovis* vi è il maiale che fino a qualche anno fa era considerato solamente uno *spillover host* (1). La maggior parte dei casi di tubercolosi nei suini è attribuibile al *Mycobacterium avium*, di conseguenza le caratteristiche dell'infezione da *M. bovis* nei suini rimane ancora argomento d'indagine. Nei paesi industrializzati i piani di eradicazione e controllo della bTB si basano principalmente sulla macellazione e l'eliminazione dei bovini individuati come sospetti infetti sulla base dell'esito delle prove *in vivo* intradermoreazione (IDT) e saggio del γ -interferone (IFN- γ) (2). Le procedure diagnostiche utilizzate per individuare bovini infetti sono state adottate anche in altre specie animali (3), ma le informazioni circa l'uso di questi approcci diagnostici nei suini sono estremamente limitate. Nelle zone in cui *M. bovis* risulta ancora presente negli allevamenti bovini e il bestiame condivide il pascolo con la popolazione suina, il ruolo marginale che finora è stato attribuito al maiale nel mantenimento dell'infezione da *M. bovis* viene fortemente messo in discussione. In un contesto di questo tipo, infatti, è stato evidenziato che i maiali possono presentare elevate percentuali d'infezione da *M. bovis* e probabilmente rappresentarne anche un vero e proprio "reservoir" (4, 5). Lo scopo di questo studio è stato valutare l'adattabilità del IFN- γ test per la rilevazione di suini infetti da *M. bovis* e confrontarne i risultati con i tradizionali metodi diagnostici *post-mortem*: l'esame anatomo-patologico (EAP) e la coltura

batterica. Questa prima sperimentazione vuole essere la base per futuri studi volti a dimostrare la validità del saggio IFN- γ come strumento per la sorveglianza di infezione da *M. bovis* nella popolazione suina.

MATERIALI E METODI

Sviluppo del protocollo e delle curve dose risposta del IFN- γ : Per mettere a punto la metodica da utilizzare nella sperimentazione, campioni di sangue *in toto* di 15 suini sani sono stati stimolati con 5 μ l/ml di PWN e/o di PBS. Dopo 24 ore di incubazione a 37 °C al 5% di CO₂ il supernatante è stato raccolto ed è stata valutata la produzione da parte dei linfociti di IFN- γ usando una sandwich ELISA (Porcine IFN-gamma Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, Mn, USA). La stimolazione con PBS non ha indotto alcuna produzione di IFN- γ , al contrario, i campioni di sangue stimolati con PWN, hanno mostrato una produzione media di IFN- γ di 2633 μ g/ml con una deviazione standard di 688,2 μ g/ml. Questi dati ci hanno portato a considerare inadeguati e di conseguenza a escludere, i campioni che, stimolati con PWN, non hanno risposto al mitogeno, presentando un OD inferiore all'OD standard contenente 1250 μ g/ml (media - 2 DS) (dati non riportati).

Animali: 100 Suini Neri Siciliani, provenienti da allevamenti con pregresse positività per bTB (4), di età compresa tra i 12-24 mesi, sono stati coinvolti nello studio dopo campionamento casuale presso il mattatoio di Mirto (ME). Il Suino Nero Siciliano è una razza locale che vive nel Parco dei Nebrodi all'interno del quale pascolano bovini provenienti da allevamenti con prevalenze di bTB che vanno dall'8.58% al 5.36% (dati 2010 Ministero della Salute).

IFN- γ test: Un campione di sangue eparinizzato (10 ml) è stato prelevato dai maiali presso il mattatoio e inviato entro 8-10 ore al laboratorio della Sezione di Barcellona dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia (IZSSI). Ogni campione è stato dispensato in aliquote da 1,5 ml in piastre da 24 pozzetti (Costar, Corning Incorporated, Corning, NY, USA).

I campioni di sangue dei 100 suini inclusi nella sperimentazione, sono stati stimolati in doppio con:

- "Phosphate Buffered Saline" (PBS 0,01 M, pH 7,2), per la valutazione del valore basale di IFN- γ ;
- il mitogeno (Pokeweed mitogen) (PWN) (5 μ l/ml) (Sigma-Aldrich, Ms, USA);
- PPD bovina (10 μ g/ml)
- PPD aviaria (10 μ g/ml).

Le PPD impiegate sono state entrambe prodotte dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche (IZSUM), secondo i protocolli previsti dal D. M. 26 giugno 1981. I campioni di sangue sono stati incubati a 37°C

in atmosfera modificata (5% CO₂) per 18-24 h. Dopo l'incubazione, ciascun campione è stato centrifugato a 500 g per 10 minuti a temperatura ambiente, il plasma è stato raccolto e stoccato a -20 °C fino al momento del test ELISA sandwich (Porcine IFN-gamma Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, Mn, USA).

Schema interpretativo I valori ottenuti per ogni campione, espressi in unità di densità ottica (OD) rilevata a 450 nm, sono stati interpretati come segue:

- Campione Negativo: il valore di OD dei campioni stimolati con PPD aviaria (AOD) e PPD bovina (BOD) era inferiore al doppio del valore di OD ottenuto per la stimolazione con PBS (2NOD);
- Campione Positivo per *M. bovis*: il valore di OD del campione stimolato con PPD Bovina (BOD) era maggiore o uguale a 2NOD e il valore di OD del campione stimolato con PPD Aviaria (AOD) era inferiore a 2NOD o quando BOD e AOD erano entrambi superiori a 2NOD e il rapporto BOD/AOD era $\geq 1,1$;
- Campione Positivo per *M. avium*: il valore di OD del campione stimolato con PPD Aviaria (AOD) era maggiore o uguale a 2NOD e il valore di OD del campione stimolato con PPD Bovina (BOD) era inferiore a 2NOD o quando AOD e BOD erano entrambi superiori a 2NOD e il rapporto BOD/AOD era $\leq 0,9$;
- Campione Dubbio: i valori BOD e AOD erano entrambi superiori a 2NOD e il rapporto BOD/AOD era compreso tra 0,9 e 1,1.

Esame anatomo-patologico (EAP): è stato condotto secondo le tradizionali metodiche ispettive presso il Mattatoio di Mirto dove si procedeva al campionamento dei singoli apparati linfonodali.

Esame colturale: Presso l'IZSUM su ogni campione pervenuto è stato effettuato l'esame colturale per l'isolamento di micobatteri, eseguito secondo le metodiche tradizionali previste dal D.M. 592/95, su terreni solidi selettivi (Lowestein-Jensen e Stonebrink). Sulle colonie tipiche, risultate positive alla colorazione per acido resistenti, l'identificazione è stata eseguita mediante tecniche bio-molecolari (6, 7).

Risultati

Dei 100 maiali coinvolti nello studio, due soggetti non hanno reagito alla stimolazione con il mitogeno (PWM), per cui gli animali effettivamente presi in considerazione nella valutazione finale sono stati 98. I risultati sono mostrati in tabella 1. Dei 98 capi, 26 (26.5 %) sono risultati positivi al test del IFN- γ .

Il test del IFN- γ ha rilevato 22 dei 26 suini con lesioni simil-tubercolari (84.6% - IC95% 52.6-100%) e ha riconosciuto come sani 68 dei 72 animali privi di lesioni (94.4% - IC 95% 92.3-96.7%); ha riconosciuto come infetti 15 suini dei 19 con positività microbiologica (78.9% - IC95% 44.8-100%). Settantadue dei 79 suini risultati negativi alla diagnosi colturale hanno reagito negativamente anche al IFN- γ test (91.1% - 71.1-100%).

Come illustrato in tabella 1, gli esiti del IFN- γ test hanno concordato in misura maggiore con le lesioni rinvenute all'esame anatomo-patologico e in misura minore con i risultati dell'isolamento colturale di *M. bovis* a partire da campioni linfonodali.

Tabella 1: Confronto tra i risultati ottenuti nel test IFN- γ , i risultati dell'EAP e dell'esame microbiologico per la ricerca di *M. bovis* P: Positivo N: Negativo.

		Lesioni		M i c r o b i o l o g i c o	
		P	N	P	N
IFN- γ	P	22	4	15	11
	N	4	68	4	68

DISCUSSIONE

Per un lungo periodo si è creduto che le popolazioni di suini domestici e selvatici potessero avere un ruolo limitato nella diffusione della tubercolosi bovina; questa convinzione nasce dal fatto che i maiali erano considerati "spillover host" e che nella stragrande maggioranza dei contesti epidemiologici sono limitate le "sovrapposizioni" ecologiche tra bovini e suini (8). In scenari epidemiologici come quello siciliano, in cui il suino condivide habitat e pasture con popolazioni di bovini che presentano un'elevata prevalenza d'infezione da *M. bovis*, si può assistere facilmente alla circolazione di questo micobatterio anche nella popolazione suina. Il ruolo del maiale come ospite "a fondo cieco" del *M. bovis* è messo in discussione. Tali condizioni rendono possibile ipotizzare l'implementazione in questa specie di strategie di controllo dell'infezione. Pertanto è sorta l'esigenza di sviluppare test diagnostici in grado di identificare *intra-vitam* i soggetti infetti. I numerosi vantaggi che il test del IFN- γ offre rispetto all'IDT hanno favorito la messa a punto (3) e la sperimentazione della metodica in diverse specie animali, cinghiale compreso (9). Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'adattabilità dell'IFN- γ test alla specie suina. Il parziale scostamento tra le positività ottenute al test e le negatività all'isolamento colturale possono essere ascritte alla capacità del test immunologico di individuare i soggetti recentemente infetti e/o con lesioni non visibili (NVL).

L'eccellente concordanza tra i risultati preliminari acquisiti dall'applicazione del test IFN- γ e quelli ottenuti dai tradizionali metodi diagnostici *post-mortem* (EAP ed esame microbiologico) incoraggiano a pianificare future ricerche volte a ottimizzarne l'esecuzione della metodica e confermarne l'affidabilità.

Sperimentazione realizzata anche grazie al finanziamento ricevuto nell'ambito del Progetto di Ricerca del Settimo Programma Quadro, denominato "Strategies for the eradication of bovine tuberculosis" (Contract Number 212414 - Acronimo TB-STEP).

BIBLIOGRAFIA

1. O'Reilly L. M., Daborn C. J., (1995) The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. Tubercle and lung disease. The official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease, 76 Suppl. 1: 1-46.
2. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2010 Chapter 2.4.7. Bovine tuberculosis (Version adopted in May 2009)
3. Waters W. R., Palmer M. V., Thacker T. C., Orloski K., Nol P., Harrington N. P., Olsen S. C., Nonnecke B. J. (2008) Blood culture and stimulation conditions for the diagnosis of tuberculosis in cervids by the Cervigam assay. Vet Rec.;162:203-8
4. Marianelli C., Cifani N., Capucchio M.T., Aronica V., Fiasconaro M., Russo M., Pasquali P., Di Marco V. (2009) Ruolo del Suino Nero Siciliano come serbatoio dell'infezione da *Mycobacterium bovis* V Workshop Nazionale di Epidemiologia Veterinaria ATTI ISTISAN Congressi: 69 .
5. Mazzone P., Corneli S., Cagiola M., Biagetti M., Ciullo M., Sebastiani C., Boniotti M.B., Pacciarini M.L., Di Marco V., Russo M., Aronica V., Fiasconaro M., Marianelli C., Pesciaroli M., Pasquali P. (2010) Ruolo del Suino Nero dei Nebrodi nell'epidemiologia della tubercolosi bovina in Sicilia; XII Congresso Nazionale SIDI LV - Atti del Congresso: 110 - 111.
6. Kulski J.K., Khinsoe C., Pryce T. and Crhistiansen K. (1995) Use of a Multiplex PCR to Detect and Identify *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* in Blood Culture Fluids of AIDS Patients. J.Clin. Microbiol., V.33, No3, 668-674.
7. Huard R.C., de Oliveira Lazzarini L.C., Butler W.R., van Soolingen D. and Ho J.L. (2003) PCR-Based Method To Differentiate the Subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex on the Basis of Genomic Deletion. J. Clin. Microbiol., Vol. 41, No 4, p. 1637-1650.
8. Serraino A., Marchetti G., Sanguinetti V., Rossi M.C., Zannoni R. G., Catozzi L., Bandera A., Dini V., Mignone W., Franzetti F., Gori A. (1999) Monitoring of transmission of Tuberculosis between Wild Boars and Cattle: Genotypical Analysis of Strains by Molecular Epidemiology Techniques J. of Clinical Microbiology, 766-2771.
9. Boadella M., Lyashchenko K., Greenwald R., Esfandiari J., Jaroso R., Carta T., Garrido J. M., Vicente J., de la Fuente J., Gortázar C. (2011) Serologic tests for detecting antibodies against *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in Eurasian wild boar (*Sus scrofa scrofa*). J Vet Diagn Invest. 23 (1): 77-83

IL VIRUS DELL'EPATITE E SUINA IN ITALIA: SETTE ANNI DI STUDI, DAGLI ALLEVAMENTI AL PRODOTTO FINITO

Di Bartolo I.¹, Angeloni G.¹, Ponterio E.¹, Maione E.¹, Ostanello F.², Ruggeri F. M.¹

¹Dip. Sanità pubblica veterinaria e sicurezza alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma.

²Dip. di Scienze mediche veterinarie, Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO).

Keywords: Hepatitis E, suino.

SUMMARY

Hepatitis E virus (HEV) is an emerging disease with a potential zoonotic transmission. The causative agent of hepatitis E is an unenveloped positive sense single-stranded RNA virus. The genome of HEV is approximately 7.2 kb and contains three open reading frames. ORF1 encodes non-structural proteins, and ORF2 and 3 code for the capsid protein and a small protein of unknown function, respectively. HEV is an emerging public health concern in many developing countries, where it can cause large epidemics mainly via contaminated water. Swine HEV strains are genetically close to human strains from the same area, suggesting the occurrence of zoonotic transmission. This route might play an important role in spreading infection also in Europe and other industrialized areas. In the last five years several investigations were performed at ISS to identify the presence of HEV swine infection within farms and slaughterhouses in Northern and Central Italy. Results of molecular diagnostic assays indicate the wide spread of HEV RNA in swine, including animals at slaughterhouse. Nucleotide sequences further confirm that the strains belong to genotype 3, also identified in humans.

INTRODUZIONE

L'Epatite E è una malattia infettiva con caratteristiche cliniche di epatite acuta. L'agente responsabile è il virus a RNA dell'Epatite E (HEV), di recente identificazione. La malattia è considerata endemica nei paesi in via di sviluppo, dove si manifesta con episodi epidemici generalmente associati al consumo di acqua contaminata. Di recente, casi sporadici di origine autoctona sono stati descritti anche in numerosi paesi industrializzati, compresa l'Italia. A partire dal 1997, ceppi suini di Epatite E (SwHEV) sono stati identificati in suini clinicamente sani nei diversi continenti. Infezioni sperimentali, studi di sieroprevalenza e analisi filogenetiche hanno dimostrato la possibile trasmissione interspecie dal suino all'uomo del virus HEV. In particolare, i ceppi di SwHEV sono spesso geneticamente simili ai ceppi responsabili di episodi sporadici di malattia nell'uomo nelle stesse aree geografiche, confermando la possibilità di una trasmissione zoonotica dell'infezione. Casi umani di epatite E sono stati recentemente correlati con il consumo di carne o organi crudi o poco cotti di suino, cinghiale e cervo.

In questo lavoro, sono riportati i dati raccolti in >7 anni di studi condotti su popolazioni di suini appartenenti a diverse classi di età. I dati dimostrano un'elevata diffusione del virus dell'HEV, anche in animali adulti prossimi alla fase di macellazione. Tutti i ceppi identificati risultano di genotipo 3.

MATERIALI E METODI

Dal 2005 ad oggi sono stati esaminati 416 campioni di feci, 185 campioni di bile, 88 campioni di fegato, prelevati da suini appartenenti a differenti categorie produttive e classi d'età: animali da ingrasso (3-4 mesi-magroni e 8-9 mesi-grassi) e da riproduzione (8-11 mesi-scrofette, 11-17 mesi-giovani scrofe, e di

età superiore ai 17 mesi-scrofe pluripare). I campioni sono stati prelevati da allevamenti a ciclo chiuso e aperto della provincia di Modena, Bologna e in diverse province del Sud Italia. Tutti gli animali esaminati risultavano clinicamente sani, a eccezione di 137 suini affetti da altre patologie (PWMS, PRRS).

Il genoma virale (RNA) è stato estratto da sospensione fecali al 10% (in acqua) o da 250mg di fegato/salsicce sottoposti a lisi meccanica, mediante il kit Qiamp-Viral RNA (Qiagen) e analizzato mediante RT-PCR e nested-PCR con primer degenerati (gene ORF2, proteina del capsido virale) (1) e nella ORF1. Inoltre, i campioni di fegato e salsiccia sono stati analizzati mediante real-time PCR (2).

Gli amplificati ottenuti (145 bp; 348bp) sono stati sequenziati utilizzando ABI PRISM BigDye Terminator kit version 2.0 (Applied Biosystems); le sequenze ottenute sono state analizzate con il software DNASIS Max 2.0 (Hitachi) e gli studi filogenetici (Figura 1) sono stati effettuati mediante il software Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

RISULTATI

Tra gennaio e giugno del 2005, sono stati prelevati 274 campioni di feci da altrettanti suini provenienti da 6 allevamenti a "ciclo chiuso" nella provincia di Modena. Dall'analisi dei campioni condotta mediante nested PCR, 115 suini sono risultati positivi per la presenza di RNA virale (Tabella 1). Nel complesso, tutti gli allevamenti sono risultati positivi con una prevalenza media del 32.1% che varia dal 12.8% (allevamento 4) al 72.5% (allevamento 2).

Tabella 1. Risultati delle nested-PCR condotte sui campioni di feci di suino, divisi per allevamento.

Tipologia allevamento*	No.	Suini positivi/totale	(%)
F-W	2	29/40	72.5
F-W	6	23/38	60.5
totale F-W		52/78	66.7
F-F	1	24/50	48.0
F-F	3	12/48	25.0
F-F	4	6/47	12.8
F-F	5	21/51	41.2
totale F-F		63/196	32.1
All farms		115/274	42.0

F-W: ciclo aperto; F-F: ciclo aperto

Tra gennaio e giugno del 2006, 137 campioni di bile sono stati raccolti da altrettanti animali affetti da diverse patologie. Quarantuno dei 137 campioni analizzati (bile, 29.9%) sono risultati positivi per HEV con almeno uno dei due set di primers

utilizzati. Non sono state rilevate associazioni statisticamente significative tra la diagnosi di infezione da HEV e la presenza di patologie concomitanti, o con le diverse tipologie di allevamento esaminate. I risultati dell'analisi multivariata indicavano che i soggetti in magronaggio (età 80-120 giorni) avevano tuttavia un rischio di infezione statisticamente più elevato rispetto ai soggetti più giovani (Odd Ratio=3.78; $p=0.009$). Nei magroni, infatti, la prevalenza riscontrata era nettamente più elevata (46.9%) rispetto ai soggetti in svezzamento (20%) (Tabella 2).

Tabella 2. Risultati delle nested-PCR condotte sui campioni di bile.

Dati		Positivi/ esaminati (%)
Età (giorni)	<80	17/85 (20.0)
	80-120	23/49 (46.9)
Patologia epatica	presente	6/24 (25.0)
	assente	35/113 (31.0)
Patologia enterica	presente	20/58 (34.5)
	assente	21/79 (26.6)
Patologia polmonare	presente	28/81 (34.6)
	assente	13/56 (23.2)
Altre patologie	presente	19/68 (27.9)
	assente	22/69 (31.9)
PCV2	positivo	14/36 (38.9)
	negativo	27/101 (26.7)
PRRSV	positivo	17/54 (28.9)
	negativo	24/83 (28.9)
Tipologia di allevamento	ciclo aperto	4/17 (23.5)
	ciclo chiuso	22/72 (30.6)

Nel 2008, 141 campioni (45 bili, 48 feci e 48 fegati) sono stati raccolti in fase di macellazione e analizzati per la ricerca di HEV. La prevalenza più elevata è stata riscontrata nei campioni di bile del 51.1% (23/45), mentre la prevalenza nelle feci era del 33.3% (16/48) e nei fegati del 20.8% (10/48) (Tabella 3), confermando l'elevata diffusione del virus in animali in fase di macellazione.

Tabella 3. Risultati della ricerca di genoma di HEV in animali prelevati al macello, divisi per classi di età.

Classe di età	Bile		Feci		Fegato	
Giovani (3-4 mesi)	13/19	68%	13/20	65%	6/20	30%
Adulti (9-10 mesi)	10/26	39%	3/28	11%	4/28	14%
Totale	23/45 ^b	51%	16/48	33%	10/48	21%

^aCampioni positivi/totale testati; prevalenza in percentuale.

^bPer tre animali, i campioni di bile non erano disponibili.

Nel 2010, sono stati raccolti campioni da 34 carcasse di suini, di 6-7 mesi, in un macello del Nord Italia. Da ogni carcassa sono stati prelevati campioni di feci, fegato e muscolo. Successivamente, 52 salsicce sono state raccolte da un sito di lavorazione delle carni, derivate dallo stesso macello coinvolto in questo studio. Infine, 77 salsicce già impacchettate sono state prelevate al punto vendita (supermercato). Tutti i campioni sono stati analizzati per la ricerca del virus HEV e di Adenovirus, come indicatore di contaminazione fecale. I risultati ottenuti mediante real-time PCR sono riassunti in tabella 4.

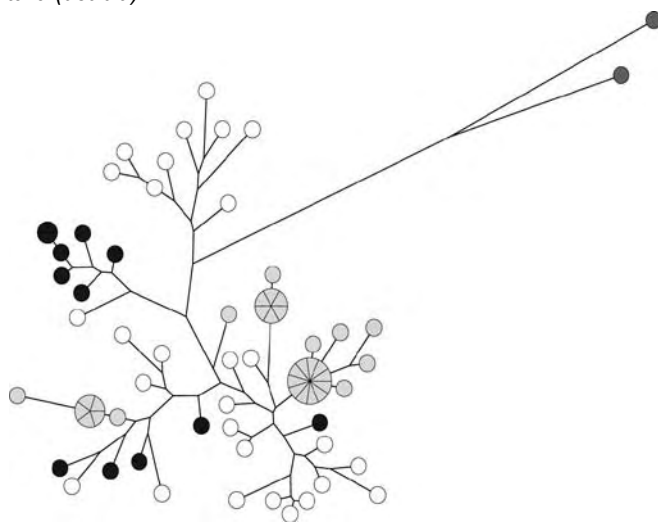
CONCLUSIONI

L'attività svolta dall'ISS su HEV g3 suino in quasi 10 anni ha riguardato diagnostica e biochimica, monitoraggio del rischio ed epidemiologia molecolare, attraverso 4 diversi Progetti Europei (3,4,5). HEV appare largamente diffuso dall'allevamento al prodotto finito della filiera del suino, a fronte di una trasmissione all'uomo apparentemente limitata. Studi di patogenesi sono necessari per valutare la possibile emersione di ceppi dotati di maggiore virulenza e capacità di trasmissione zoonotica.

Tabella 4. Riassunto dei campioni raccolti nei diversi siti della catena di produzione del suino, risultati ottenuti per la ricerca PAdV e del virus dell'HEV.

Fase		Virus	Totale	Positivi	Pos/tot
Macello	Feci	PAdV	34	31	91%
		HEV	34	14	41%
	Fegato	PAdV	34	0	-
		HEV	34	2	6%
	Muscolo	PAdV	34	1*	3%
		HEV	34	1**	3%
Lavorazione	Salsicce	PAdV	52	0	-
		HEV	52	0	-
Punto vendita	Salsicce	PAdV	77	1	2%
		HEV	77	0	-

Figura 2. Albero filogenetico (maximum parsimony tree) in cui sono stati inclusi gruppi rappresentativi dei ceppi suini appartenenti a diversi sottotipi g3 (dot in bianco), ceppi suini italiani identificati negli studi descritti (in celeste) e ceppi umani di HEV identificati in Italia (dot blu).



REFERENZE

- Erker JC, et al., (1999) A hepatitis E virus variant from the United States: molecular characterization and transmission in cynomolgus macaques. J. Gen. Virol. 80:681-90.
- Jothikumar, N., et al., (2006) A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. J Virol Methods. 131: 65-71.
- Di Bartolo I, Martelli F, Inglese N, Pourshaban M, Caprioli A, Ostanello F, Ruggeri FM. (2008) Widespread diffusion of genotype 3 hepatitis E virus among farming swine in Northern Italy. Vet. Microbiol. 132:47-55.
- Martelli F, Toma S, Di Bartolo I, Caprioli A, Ruggeri FM, Lelli D, Bonci M, Ostanello F. 2010 Detection of Hepatitis E Virus (HEV) in Italian pigs displaying different pathological lesions. Res Vet Sci.88:492-6.
- Di Bartolo I, Ponterio E, Castellini L, Ostanello F, Ruggeri FM. (2011). Viral and antibody HEV prevalence in swine at slaughterhouse in Italy. Vet. Microbiol. 149: 330-338.

PARAMETRI SIEROLOGICI E VIROLOGICI IN CAPRE VACCINATE CON SRLV CEPPO ROCCAVERANO ED INFETTATE CON CEPPO ETEROLOGO CAEV-CORK

Bertolotti L.^a, Mazzei M.^b, Camero M.^c, Profiti M.^a, Cavalli A.^c,
De Meneghi D.^a, Carrozza M.L.^d, Perona G.^e, Rosati S.^a

a. Dipartimento di Produzioni Animali Epidemiologia ed Ecologia, Università degli Studi di Torino

b. Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti, Università di Pisa

c. Dipartimento di Sanità pubblica e zootecnia, Università di Bari

d. Scuola Normale Superiore, Pisa

e. CISRA - Centro Interdipartimentale Ricovero Animali, Università degli Studi di Torino

Keywords: Lentivirus, Roccaverano, vaccinazione, carica provirale

SUMMARY This study shows for the first time that goats experimentally infected with SRLV Roccaverano strain and challenged with a virulent CAEV strain, develop an adaptive immune response able to reduce CAEV-CO proviral load, in some cases to an undetectable level. Thus, immunisation using low pathogenic strains (genotype E) confers a degree of protection at the proviral load level against pathogenic strains (CAEV-CO) and may open new chances on SRLV immunisation strategies.

INTRODUZIONE

I lentivirus dei piccoli ruminanti (SRLV) sono attualmente classificati in 5 genotipi (da A ad E). Il genotipo di più recente identificazione (genotipo E) è stato rilevato in alcuni nuclei caprini in Piemonte e Sardegna ed è caratterizzato da due grosse delezioni nel genoma, corrispondenti alla subunità dUTPasi del gene *pol* e al gene accessorio VPR-like. Ciò sembra conferire una ridotta virulenza, in analogia a quanto osservato sperimentalmente su ceppi artritici in cui tali subunità sono state artificialmente delete. Inoltre fra i ceppi appartenenti al genotipo E, lo stipite Roccaverano appare ulteriormente attenuato per la incapacità di replicare al di fuori della linea monocito-macrofagica. Questo sembra essere il risultato di un adattamento del virus in una popolazione caprina isolata e progressivamente ridottasi a pochi esemplari. Mutazioni nelle regioni ipervariabili del gene *env* ed esperimenti in vitro indicano che il ceppo Roccaverano utilizza un diverso recettore cellulare sui macrofagi, non presente sui fibroblasti.

In vivo il cluster virale riconducibile al prototipo Roccaverano è presente in poche decine di esemplari ed è strettamente associato alla razza caprina autoctona da cui prende il nome, viene trasmesso esclusivamente per via verticale e si mantiene in alcune linee familiari. La razza Roccaverano è sempre stata considerata resistente alle infezioni da SRLV, in particolare verso i ceppi artritici appartenenti al genotipo B (CAEV-like), introdotti nella Langa astigiana negli anni ottanta con l'importazione di razze caprine francesi. Tale considerazione, alla luce di quanto scoperto recentemente, suggerisce una ulteriore suggestiva ipotesi e cioè che una precedente esposizione al ceppo Roccaverano conferisca una resistenza su base immunologica verso ceppi eterologhi. In un precedente lavoro abbiamo dimostrato che la risposta immunitaria in soggetti sperimentalmente infettati con il ceppo Roccaverano si sviluppa in modo classico (umorale e cellulo-mediata), ma solo l'attività citotossica mediata dai CD8 risulta attiva verso ceppi eterologhi.

Nel presente lavoro abbiamo sperimentalmente riprodotto la doppia infezione, mediante vaccinazione con ceppo Roccaverano e challenge con ceppo CAEV-Cork. I parametri sierologici sono stati valutati per una conferma dell'avvenuta infezione ed i parametri virologici, come carica provirale del ceppo challenge nel sangue periferico, per valutare se vi fossero differenze significative fra il gruppo vaccinato ed il gruppo di controllo.

MATERIALI E METODI

Disegno sperimentale

Sono stati selezionati in totale 22 animali, divisi in tre gruppi omogenei per età: 8 animali vaccinati con virus vivo attenuato ceppo Roccaverano (gruppo A), 8 animali non vaccinati (gruppo B); 6 animali di controllo (gruppo C).

In base a esperienze maturate in un precedente esperimento pilota su 4 soggetti, si è scelto di inoculare il vaccino per via intratracheale. Infatti, sebbene il midollo osseo rappresenti una riserva di promonociti in attiva replicazione e quindi l'inoculazione per via midollare esiti in una rapida e solida sieroconversione, è stata scelta la via intratracheale perché ritenuta più pratica e meno invasiva. Le otto capre del gruppo A sono state sottoposte a vaccinazione con virus vivo attenuato alla dose di 5×10^5 TCID₅₀/2ml per via intratracheale. Dopo 4 mesi, sia le capre del gruppo A che le capre del gruppo B sono state infettate con virus challenge inoculato nell'articolazione del carpo destro.

Analisi sierologica

I prelievi di sangue sono stati effettuati a cadenza settimanale per il primo mese post vaccinazione, bisettimanale per il successivo mese e mezzo, mensile per successivi due mesi; i restanti prelievi sono stati eseguiti a distanza di un mese e mezzo l'uno dall'altro, per un totale di 14 prelievi.

I campioni di sangue sono stati prelevati utilizzando la vena giugulare e adoperando provette Vacutainer con EDTA per la raccolta del plasma e del *buffy coat*.

Il plasma di ogni prelievo è stato testato per la presenza di anticorpi verso le porzioni immunodominanti delle proteine di matrice (p25) e del capside (p16) e della regione variabile SU5 della proteina dell'envelope.

Carica provirale

Da ogni campione di *buffy coat* è stato estratto il DNA genomico mediante kit commerciale (Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit). Il DNA è stato quantificato con metodo spettrofotometrico o fluorimetrico (NanoDrop 2000c, PicoGreen dsDNA Assay Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA). Cinquecento nanogrammi di DNA sono stati usati come template per due diversi saggi RealTime PCR, al fine di valutare la carica provirale nel sangue degli animali considerati. Brevemente, due diversi protocolli qRealtime PCR sono stati ottimizzati utilizzando la metodica Taqman, diretti ad amplificare e identificare due regioni geniche diverse del DNA provirale integrato: le regioni interne di *gag* (protocollo 1) e di *pol* (protocollo 2). Sono state usate come target di sonde genotipo-specifiche sia in PCR simplex (1) che in duplex (2). Al fine di quantificare il numero assoluto di copie di DNA provirale integrato, i valori di *cycle threshold* (ct) di ogni campione sono stati confrontati con una curva standard ottenuta da concentrazioni crescenti di un plasmide di controllo e ottimizzata per ogni stipite virale. Ogni prelievo di ciascun animale è stato testato con entrambe le metodiche. I risultati sono stati analizzati confrontando le cariche

provirali negli animali appartenenti al gruppo A e B, in modo da evidenziare eventuali differenze. Le cariche provirali dei due gruppi sono state confrontate utilizzando il test statistico Wilcoxon-Mann-Whitney, considerando ogni prelievo.

RISULTATI

La sieroconversione è stata valutata utilizzando un primo test ELISA indiretto basato su un antigene ricombinante formato dalla fusione delle proteine della matrice e del capsido (p16-25) per i genotipi B ed E, e successivamente utilizzando peptidi sintetici disegnati sulla base delle sequenze dell'epitopo SU5 di entrambi i genotipi. Tutti gli individui vaccinati (gruppo A) hanno mostrato un aumento della carica anticorpale nei confronti del genotipo E e, successivamente al *challenge*, nei confronti del genotipo B. Gli animali non vaccinati (gruppo B) hanno sierconvertito nei confronti del genotipo B a partire dal 14° giorno *post challenge*. Negli animali del gruppo B il titolo anticorpale nei confronti del genotipo E si è sempre mantenuto intorno a valori nulli, dimostrando l'assenza di cross-reazione anticorpale fra antigeni eterologhi (Figura 1).

La stima della carica provirale dei ceppi Roccaverano e CAEV-Cork ha permesso di valutare l'efficacia della vaccinazione con il ceppo Roccaverano nei confronti di una superinfezione da parte del ceppo artritico CAEV.

Entrambe le metodiche di qRealtime PCR hanno evidenziato come gli animali precedentemente vaccinati con il ceppo virale Roccaverano presentino un numero di copie del provirus CAEV-Cork significativamente inferiore rispetto agli animali non vaccinati. In maggiore dettaglio, a partire da 141 giorni post infezione, corrispondente al prelievo numero 9, la differenza tra i valori di carica provirale CAEV (espressa in numero di copie per nanogrammi di DNA estratto) negli animali del gruppo A e del gruppo B, risulta statisticamente significativa (Wilcoxon-Mann-Whitney $p < 0.05$) nei tempi 9, 10, 12, 13 e 14.

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti in questo studio dimostrano che animali vaccinati con il ceppo a bassa patogenicità Roccaverano e infettati con il ceppo artritico CAEV Cork sierconvertono in modo convenzionale verso quest'ultimo, sia in termini di precocità che di carica anticorpale. Tuttavia, analizzando la carica provirale del ceppo challenge mediante l'utilizzo di due diverse metodiche *realtime* si evince che nel gruppo di animali vaccinati risulta statisticamente più bassa rispetto al gruppo di controllo. Questo aspetto è particolarmente importante da un punto di vista biologico: infatti, è da considerare che la carica provirale condiziona i tempi e l'entità della colonizzazione del virus nelle sedi periferiche, con implicazioni cliniche e epidemiologiche. È noto dalla letteratura che animali che presentano cariche provirali maggiori, sviluppano forme cliniche più precoci e gravi, mentre la modesta colonizzazione in alcune sedi periferiche potrebbe ridurre la diffusione dell'infezione per via orizzontale.

L'utilizzo di un ceppo attenuato antigenicamente differente dal ceppo *challenge* rappresenta una strategia nuova mai provata fino ad oggi. La mancata cross-reattività degli anticorpi rilevati sia verso le proteine gag che env dei due virus sembra infatti vantaggiosa ai fini protettivi. È stato dimostrato in precedenti studi che animali vaccinati con stipti inattivati omologhi al ceppo *challenge* inducevano lesioni immunomediate più gravi rispetto al gruppo di controllo. Nel nostro esperimento, l'unica cross-reattività sembra coinvolgere epitopi riconosciuti dai CD8 che ben spiegherebbe la bassa carica virale nelle sedi di persistenza dell'infezione. In conclusione questo studio sperimentale offre una nuova interpretazione per spiegare la resistenza della razza Roccaverano verso i ceppi CAEV-like e pone le basi per un

razionale sviluppo di una nuova generazione di vaccini attenuati per SRLV.

RINGRAZIAMENTI

Il presente lavoro è stato finanziato da: PRIN 2008; Regione Piemonte, Ricerca Sanitaria Finalizzata, anni 2008 e 2009. Si ringrazia il sig. Roberto Maritano, CISRA, per la costante collaborazione nella gestione dei gruppi sperimentali.

Figura 1. Sieroconversione verso l'antigene SU5. sierconversione verso lo stipite Roccaverano: linea continua//punti; sierconversione verso lo stipite CAEV: linea tratteggiata//quadrati; range interquartile: linea verticale.

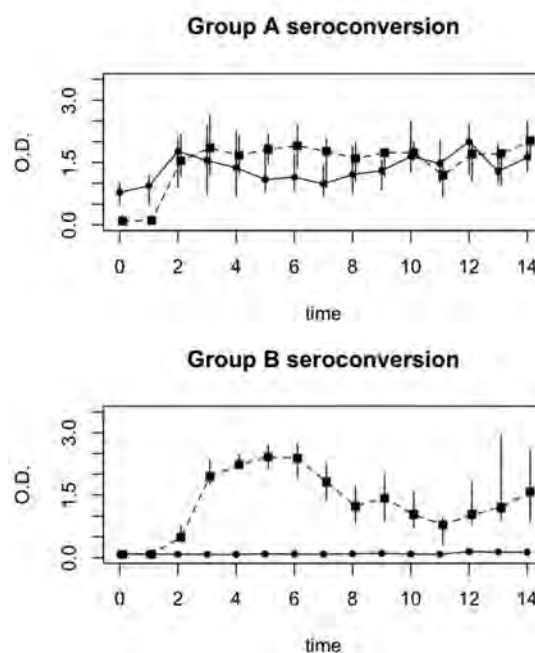
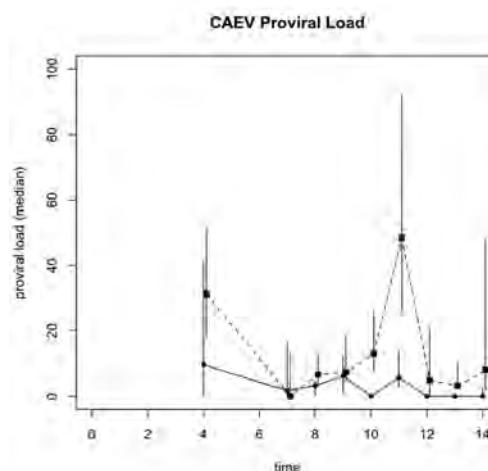


Figura 2. Carica Provirale del ceppo CAEV nel sangue degli animali dei gruppi A e B calcolata a T4, T7-T14. Carica provirale (mediana) nel gruppo A: linea continua//punti; carica provirale (mediana) nel gruppo B : linea tratteggiata//quadrati; range interquartile: linea verticale.



Bibliografia: Reina et al. *Vet Immunol Immunopathol* 139 (2011) 237–244; Juganaru et al. *Virology* 410 (2011) 88–95; Grego et al. *J Gen Virol* (2007), 88, 3423–3427.

CORONAVIRUS RICOMBINANTI DEL CANE

Decaro N.

¹Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Facoltà di Medicina Veterinaria di Bari, Valenzano (BA)

Key words: Coronavirus del cane, Coronavirus suino, Ricombinazione genetica

SUMMARY

Canine coronavirus (CCoV) is strictly related to coronaviruses of cats and pigs, with which it is now included in a unique viral species. Currently, two genotypes of CCoV are known, that have been designated CCoV types I (CCoV-I) and II (CCoV-II). CCoV-I has been further classified into two subtypes, CCoV-IIa and CCoV-IIb, including "classical" CCoVs and TGEV-like strains, respectively. Subtype CCoV-IIb has been reported in several European countries, as well as in Japan.

INTRODUZIONE

I coronavirus (ordine *Nidovirales*, famiglia *Coronaviridae*) sono virus di grandi dimensioni, con genoma ad RNA monocatenario a polarità positiva (1). Pur essendo generalmente responsabili di lievi infezioni enteriche e/o respiratorie nei mammiferi e negli uccelli, i coronavirus possiedono una notevole spinta evolutiva, la quale, mediante processi di ricombinazione genetica e/o mutazioni puntiformi, può dare facilmente origine a nuovi genotipi o mutanti con diverso tropismo tissutale o spettro d'ospite. La capacità di questi virus di superare la barriera di specie ed infettare nuovi ospiti è ben conosciuta anche in ambito umano, dove alcuni coronavirus identificati negli ultimi anni (virus della SARS, coronavirus umani OC43 e 4408) sono di sicura origine zoonotica, essendo derivati da virus circolanti nei pipistrelli (virus della SARS) o nella specie bovina (HCoV-OC43, HCoV-4408). I due terzi della porzione 5' dell'RNA genomico sono costituiti da due ORF parzialmente sovrapposte (ORF1a e ORF1b) che codificano per proteine non strutturali, tra le quali la RNA-polimerasi virale, mentre l'ultima parte del genoma codifica per proteine strutturali e non strutturali. Le proteine strutturali sono: la proteina degli spikes (S), la proteina transmembranaria (M), la piccola proteina di membrana (E), la proteina del nucleocapside (N). Alcuni coronavirus possiedono un'altra glicoproteina di superficie, la emagglutinina-esterasi (HE), che sembra essere derivata dalla analoga proteina dei virus influenzali tipo C. Sono inoltre noti diversi geni accessori (in numero e posizione variabili) che codificano per proteine non strutturali, la cui funzione è ancora sconosciuta (1).

L'*International Committee for Taxonomy of Viruses* ha recentemente suddiviso la famiglia *Coronaviridae* in due sottofamiglie, *Coronavirinae* e *Torovirinae*, la prima delle quali comprende i generi *Alpha-*, *Beta-* e *Gammacoronavirus*, corrispondenti ai vecchi gruppi antigenici 1, 2 e 3. Il coronavirus enterico del cane (CCoV) appartiene al genere *Alphacoronavirus* ed è stato incluso in unica specie virale insieme ai coronavirus del gatto (FCoV tipo I e tipo II) e ad alcuni coronavirus dei suini, quali il virus della gastroenterite trasmissibile (TGEV) ed il coronavirus respiratorio del suino (PRCoV). Come altri coronavirus, CCoV è andato incontro a rapida evoluzione genetica e, negli ultimi anni, sono stati segnalati stipiti particolarmente patogeni o divergenti dal punto di vista genetico (2, 3). Attualmente sono noti due distinti genotipi di CCoV, classificati in base alle correlazioni genetiche con i coronavirus felini esistenti a livello di proteina

degli spikes: CCoV tipo I è geneticamente correlato a FCoV tipo I, mentre CCoV tipo II (quello conosciuto da più tempo) è correlato a FCoV tipo II. CCoV tipo I non è stato adattato alla crescita in vitro e si differenzia dal genotipo II anche per la presenza di un gene accessorio, denominato ORF3 (4). CCoV causa blande infezioni autolimitanti della mucosa intestinale, con sviluppo di sintomatologia gastroenterica caratterizzata da anoressia, diarrea di tipo mucoidale e, talvolta, vomito. Nel 2005 è stata segnalata una variante altamente patogena di CCoV (CCoV pantropico), responsabile di una grave malattia sistemica ad esito letale in cuccioli di 6-8 settimane (5).

IDENTIFICAZIONE DI CCoV RICOMBINANTI CON TGEV

L'evoluzione di CCoV e TGEV è strettamente interconnessa. Infatti, è stato ipotizzato che CCoV-II abbia dato origine a TGEV mediante trasmissione interspecie e tale ipotesi è supportata dalla elevata correlazione genetica tra i due virus e dalla presenza di residui di ORF3 nel genoma di CCoV-II e di TGEV (4). Una ulteriore conferma della spinta evolutiva dei coronavirus mediante ricombinazione genetica è stata offerta dalla segnalazione di stipiti CCoV-II ricombinanti con TGEV a livello della estremità 5' del gene S.

Le prime indagini sono state condotte su quattro ceppi CCoV-II identificati, tra la fine del 2005 e l'inizio del 2008, negli organi di altrettanti cuccioli morti a seguito di una sintomatologia gastroenterica grave e pervenuti all'Istituto di Malattie Infettive della Facoltà di Medicina Veterinaria di Bari (6). Test molecolari hanno permesso di evidenziare nel contenuto intestinale di tutti i cuccioli sia CCoV-II che parvovirus del cane (variante 2a). Inaspettatamente l'RNA di CCoV-II è stato ritrovato anche negli organi interni di tutti e quattro i cani, seppure con una distribuzione tissutale variabile. La caratterizzazione molecolare dei quattro ceppi ha evidenziato una organizzazione genomica tipica dei classici CCoV-II, caratterizzata dalla presenza, in senso 5'-3', di ORF codificanti per le proteine S, 3a, 3b, 3c, E, M, N, 7a e 7b. Tuttavia, la proteina S dei ceppi sequenziati ha presentato una identità aminoacidica maggiore con i virus TGEV rispetto agli altri ceppi CCoV-II. Questo è apparso fortemente evidente nell'estremità amino-terminale della proteina che, mediante analisi di sequenza, ha presentato una similarità aminoacidica compresa tra il 76,3 ed l'82,3% con i classici stipiti TGEV, e solo del 21,9-26,4% con gli altri stipiti CCoV-II incluso il ceppo pantropico CB/05. Il resto del genoma è risultato strettamente correlato ai CCoV classici come, ad esempio, dimostrato dalla presenza della ORF3b. Infatti, in TGEV la ORF3b non è espressa, a causa di una delezione che esita in un salto nel *frame* di lettura della sequenza genomica. Inoltre, alla estremità 3' del genoma virale dei ceppi TGEV-like, sono state identificate sia la ORF7a che la ORF7b, tipiche dei CCoV classici, mentre TGEV presenta la sola ORF7. La mancanza di questi due geni accessori e la presenza di *remnants* della ORF3 in CCoV-II e TGEV lascia ipotizzare l'origine di TGEV da un salto di specie e successivo adattamento di uno stipite CCoV al suino. A supporto di tale ipotesi, TGEV e CCoV-II mostrano un elevato grado di similarità in tutte le proteine strutturali a valle della terminazione

5' della ORF2 (4). Per quanto riguarda l'origine dei ceppi TGEV-like, i dati raccolti hanno permesso di ipotizzare un processo di ricombinazione tra coronavirus canini e suini. Nell'ambito di tale ricombinazione, TGEV avrebbe donato la terminazione 5' del gene S. Gli stipiti TGEV-like sono stati anche caratterizzati da un punto di vista antigenico, evidenziando delle differenze con i classici ceppi CCoV. Anticorpi monoclonali specifici per TGEV, ma non per i CCoV, hanno reagito con tutti i ceppi TGEV-like. Inoltre, i sieri dei cani infettati sperimentalmente hanno presentato solo una debole cross-reattività con un classico ceppo CCoV enterico. La identificazione degli stipiti TGEV-like ha permesso la suddivisione del genotipo II in due sottotipi, CCoV-IIa e CCoV-IIb, i quali includono rispettivamente stipiti classici e stipiti TGEV-like (6).

EPIDEMIOLOGIA DEGLI STIPITI TGEV-LIKE (CCoV-IIb)

Una successiva indagine epidemiologia ha valutato la distribuzione degli stipiti TGEV-like (CCoV-IIb) nella popolazione canina europea (7). A tal scopo, sono stati raccolti 1.172 campioni fecali da cani con gastroenterite. Positività per CCoV è stata ottenuta in real-time RT-PCR da 493 campioni (42,06%). CCoV-II è stato identificato in 218 campioni come infezione singola, mentre ulteriori 182 feci hanno fornito esito positivo per entrambi i genotipi CCoV-I e CCoV-II. Circa il 20% dei campioni positivi per CCoV-II sono risultati contenere stipiti TGEV-like (sottotipo CCoV-IIb), con una diversa distribuzione a seconda del Paese di origine. In particolare, CCoV-IIb è risultato maggiormente diffuso in Ungheria, dove il 96,87% degli stipiti CCoV-II sono stati caratterizzati come sottotipo IIb, mentre in Grecia la prevalenza del virus ricombinante è stata pari solo al 3,45%. L'analisi di sequenza e la filogenesi condotte su 26 stipiti TGEV-like rappresentativi delle diverse aree geografiche dell'Europa hanno dimostrato che tali virus risultano correlati, sia nella porzione 5' che 3' del gene S, agli stipiti CCoV-IIb prototipi. Tuttavia, mentre gli stipiti britannici segregavano separatamente, quelli italiani ed est-europei erano dispersi all'interno di un unico cluster.

Ricerche condotte da altri autori hanno dimostrato la circolazione del sottotipo IIb in Grecia (8), e Giappone (9).

I risultati delle indagini epidemiologiche hanno prospettato nuovi scenari per quanto riguarda la profilassi vaccinale della coronavirosi del cane. Infatti, tutti i vaccini disponibili in commercio per CCoV contengono stipiti classici non ricombinanti (CCoV-IIa), i quali sono risultati solo parzialmente cross-neutralizzanti nei confronti degli stipiti TGEV-like (6). Pertanto, l'ampia distribuzione degli stipiti TGEV-like nella popolazione canina europea potrebbe mettere in discussione la reale efficacia dell'attuale vaccinazione nei confronti dell'infezione sostenuta da stipiti CCoV ricombinanti.

MESSA A PUNTO DI UN VACCINO SPECIFICO PER CCoV-IIb

Un vaccino specifico per gli stipiti CCoV-IIb è stato messo a punto mediante inattivazione con betapropiolattone ed emulsione con adiuvante MF59™ (10). Le caratteristiche di innocuità, immunogenicità ed efficacia di tale vaccino sono state valutate in vivo. Cinque cuccioli beagle di 10 settimane di età sono stati vaccinati per due volte, a distanza di tre settimane, con il vaccino sperimentale, mentre altri due cuccioli sono stati utilizzati come controlli per il successivo *challenge*. Il vaccino si è dimostrato innocuo poiché non ha determinato reazioni locali né sistemiche a seguito di nessuna delle due vaccinazioni. Anticorpi specifici per CCoV-IIb sono stati dimostrati nei soggetti vaccinati a partire da 14 o 28 giorni post-vaccinazione, a seconda del test impiegato (rispettivamente ELISA e virus neutralizzazione). La

successiva somministrazione di uno stipite CCoV-IIb virulento ha determinato la comparsa di una blanda sintomatologia gastroenterica nei controlli, mentre i cuccioli vaccinati sono stati completamente protetti dalla forma clinica. Il virus è stato escreto con le feci in entrambi i gruppi di animali (vaccinati e controlli), ma nel gruppo dei vaccinati l'escrezione è stata di più breve durata ed i titoli virali sono risultati molto più bassi rispetto ai controlli. Il vaccino messo a punto potrebbe essere impiegato in allevamenti, canili e rifugi sanitari per contenere l'infezione sostenuta da CCoV-IIb e prevenire le forme cliniche associate a tale infezione, le quali sono particolarmente gravi in ambienti sovraffollati e con scarse condizioni igieniche.

BIBLIOGRAFIA

- Enjuanes L., Brian D., Cavanagh D., Holmes K., Lai M. M. C., Laude H., Masters P., Rottier P. J. M., Siddell S. G., Spaan W. J. M., Taguchi F., Talbot P. (2000). Coronaviridae. In "Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses" Eds. M.H.V. van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle, R.B. Wickner, Academic Press, New York. pp. 835-849.
- Decaro N., Buonavoglia C. (2008). An update on canine coronaviruses: Viral evolution and pathobiology. *Veterinary Microbiology*, 132: 221-234.
- Decaro N., Buonavoglia C. (in press). Canine coronavirus: not only an enteric pathogen. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*.
- Lorusso A., Decaro N., Schellen P., Rottier P.J., Buonavoglia C., Haijema B.J., de Groot R.J. (2008). Gain, preservation, and loss of a group 1a coronavirus accessory glycoprotein. *Journal of Virology* 82: 10312-10317.
- Buonavoglia C., Decaro N., Martella V., Elia G., Campolo M., Desario C., Castagnaro M., Tempesta M., (2006). Canine coronavirus highly pathogenic for dogs. *Emerging Infectious Diseases*, 12: 492-494.
- Decaro N., Mari V., Campolo M., Lorusso A., Camero M., Elia G., Martella V., Cordioli P., Enjuanes L., Buonavoglia C. (2009). Recombinant canine coronavirus related to transmissible gastroenteritis virus of swine are circulating in dogs. *Journal of Virology*, 83: 1532-1537.
- Decaro N., Mari V., Elia G., Addie D. D., Camero M., Lucente M. S., Martella V., Buonavoglia C. (2010). Recombinant canine coronaviruses in dogs, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 16: 41-47.
- Ntakis V., Mari V., Decaro N., Papanastassopoulou M., Papaioannou N., Mpatziou R., Buonavoglia C., Xylouri E. (2011). Isolation, tissue distribution and molecular characterization of two recombinant canine coronavirus strains. *Veterinary Microbiology*, 151: 238-244.
- Soma T., Ohinata T., Ishii H., Takahashi T., Taharaguchi S., Hara M. (2011). Detection and genotyping of canine coronavirus RNA in diarrheic dogs in Japan. *Research in Veterinary Science*, 90: 205-207.
- Decaro N., Mari V., Sciarretta R., Colao V., Losurdo M., Catella C., Elia G., Martella V., Del Giudice G., Buonavoglia C. (2011). Immunogenicity and protective efficacy in dogs of an MF59™-adjuvanted vaccine against recombinant canine/porcine coronavirus. *Vaccine*, 29: 2018-2023.

RINGRAZIAMENTI: Il presente studio è stato realizzato grazie ai finanziamenti della Ricerca Finalizzata 2007, progetto "Mammal coronaviruses: molecular epidemiology, vaccine development and implications for animal and human health".

STANDARDIZZAZIONE DI UN PROTOCOLLO MLVA PER LA GENOTIPIZZAZIONE DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* DI ISOLAMENTO UMANO E ALIMENTARE

Parisi A.¹, Miccolupo A.¹, Latorre L.¹, Bilei S.², Cogoni M. P.³, Costa A.⁴, Santagada G.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata - Foggia;

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e Toscana - Dip. Roma;

³Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna - Dip. Cagliari;

⁴Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia - Dip. Palermo;

Key words: *L. monocytogenes*, Multi-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis, MLVA

SUMMARY

In this survey Multi-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) has been standardized and used to study 280 *L. monocytogenes* isolates from human, and food sources. A total of 83 MLVA types were identified. LMV1 and 3 were the most discriminative loci with a DI of 79.5 and 79.1 %, respectively. The present study confirmed the high value of MLVA subtyping for studying the epidemiology of *L. monocytogenes*.

INTRODUZIONE

Listeria monocytogenes è l'agente causale della listeriosi, una malattia sporadica che colpisce soprattutto alcune categorie di popolazione ad elevato rischio. Nel 2008 l'incidenza in Europa è stata pari a 0.4 casi su 100.000 abitanti; l'Italia nel periodo 2005-09 ha registrato un significativo incremento dei casi clinici. Nonostante i bassi tassi di incidenza, l'interesse nei confronti di tale malattia è giustificato dall'elevato tasso di mortalità (20-30%), infatti la listeriosi risulta una delle cause più frequenti di decesso connessa a malattie trasmesse da alimenti (1).

L. monocytogenes è largamente diffusa nell'ambiente e negli alimenti sia di origine animale che vegetale, anche se la fonte alimentare è ritenuta la principale via di contagio per l'uomo. Negli ultimi anni le tecniche di caratterizzazione genetica, in particolar modo quelle basate sull'analisi delle sequenze del DNA (MLST, MLVST), hanno consentito di acquisire importanti informazioni relative alla organizzazione della popolazione di *L. monocytogenes*, identificando quattro distinte linee genetiche (3). Inoltre gli studi molecolari hanno permesso di osservare una diversa distribuzione dei profili genetici negli isolati clinici, alimentari ed ambientali. La linea genetica I è più frequentemente coinvolta negli episodi clinici rispetto alla linea genetica II che è più frequente negli isolati alimentari, mentre le linee genetiche III e IV sono state identificate solo recentemente e sono più diffuse negli animali ed in particolar modo nei ruminanti. Sebbene queste tecniche presentino indiscutibili vantaggi sia dal punto di vista informativo che dal punto di vista tecnico, esse hanno dei limiti legati alla complessità ed al costo di esecuzione che ne limitano l'applicazione estensiva in campo. In un recente lavoro abbiamo potuto dimostrare come la tecnica di Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) riesca a fornire una informazione largamente sovrapponibile a MLST seppur con livelli di processività e di costi nettamente più vantaggiosi (4). Lo scopo di questo lavoro era la standardizzazione di un protocollo MLVA per lo studio dell'epidemiologia di *L. monocytogenes* e l'applicazione su 280 stipiti isolati da casi clinici e da fonti alimentari.

MATERIALI E METODI

Complessivamente sono stati esaminati un totale di 280 ceppi provenienti da casi clinici (n=67) e di isolamento alimentare (n=213). Gli isolati appartenevano ai seguenti sierotipi: 1/2a (n=108), 1/2b (n=43), 1/2c (n=67), 3a (n=6), 3b (n=2), 3c

(n=1), 4b/4e (n=50), 4c (n=2), 4d (n=1). Preliminarmente una selezione di 30 isolati rappresentativi delle principali linee genetiche venivano sottoposti ad uno screening utilizzando 13 diversi VNTR come precedentemente descritto (2, 6). Quindi si effettuava una selezione dei VNTR in funzione della riproducibilità, stabilità e capacità di discriminazione. Un totale di 6 VNTR veniva ottimizzato per l'amplificazione in due distinte multiplex-PCR, quindi i prodotti di reazione venivano diluiti e miscelati in una mix contenente formammide e Genescan 600 Liz come ladder di peso molecolare. Le corse elettroforetiche erano eseguite mediante 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). I dati venivano analizzati mediante GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems), i singoli alleli venivano normalizzati, importati in Bionumerics 6.5 (Applied Maths) ed utilizzati per l'analisi filogenetica mediante Minimum Spanning Tree (MST) (Fig. 1).

RISULTATI

Complessivamente sono stati identificati 83 differenti profili allelici (MLVA). I singoli VNTR mostravano valori di Discriminatory Index di Simpson variabili tra 52.4 e 79.5 (Tab. 1) con un numero variabile di alleli compreso tra 4 e 10. I profili MLVA presentavano una buona correlazione con la appartenenza degli stipiti ai singoli sierotipi ed alle principali linee genetiche.

Locus	Alleli n.	DI (%)
LMV1	8	79.5
3	10	79.1
LMV9	4	52.4
32	7	71.6
LMV6	6	60.8
15	7	71.1

Tab. 1 VNTR. Sono illustrati per ciascun locus il numero di alleli e il DI di Simpson (%).

DISCUSSIONE

Le nuove acquisizioni nel settore dell'epidemiologia molecolare di *L. monocytogenes* hanno consentito di formulare ipotesi circa l'organizzazione della popolazione di questo microrganismo, sulla sua evoluzione prettamente clonale che ha consentito la suddivisione di linee genetiche ben distinte, nonché sull'attitudine di certi genotipi a dare malattia nell'uomo o a colonizzare determinate nicchie ecologiche. La sierotipizzazione, che in passato ha rappresentato il sistema

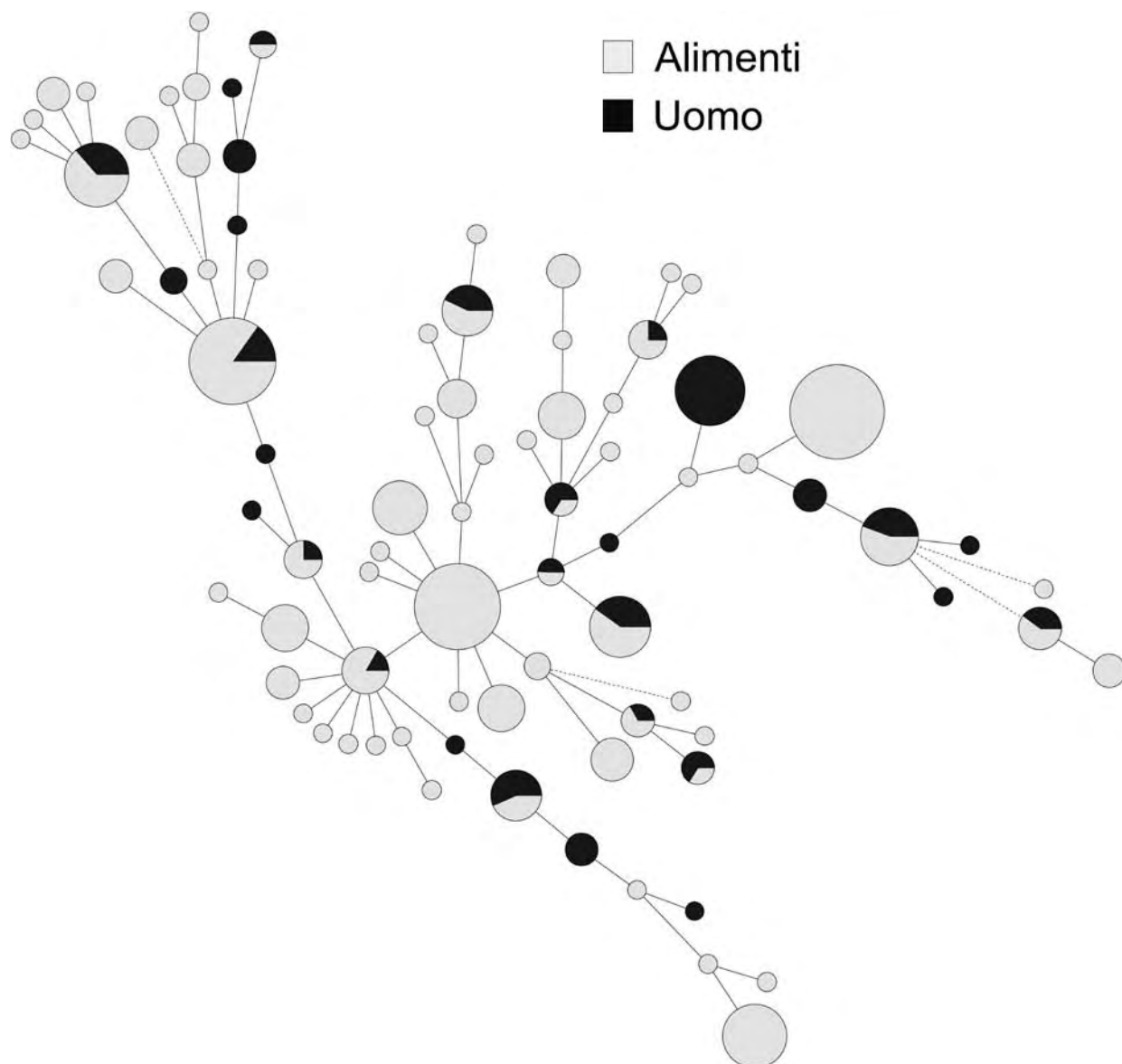
classico di riferimento, presenta dei limiti dal momento che oltre il 95% degli stipiti isolati da casi di listeriosi nell'uomo o da fonti alimentari appartengono ai sierotipi 1/2a, 1/2b e 4b (5). Tra i 67 isolati umani inclusi in questo studio il sierotipo prevalente è risultato 1/2a (n=39) seguito da 4b/4e (n=23), 1/2b (n=4) e 1/2c (n=1). Negli ultimi anni, per la caratterizzazione genetica di *L. monocytogenes*, è stata utilizzata come metodo di routine la Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) anche se le difficoltà di riproducibilità di questa tecnica fanno ritenere che nel prossimo futuro i sistemi sequence-based (MLST, MLVST) rappresenteranno lo standard di riferimento. Purtroppo le problematiche legate alla complessità tecnica ed ai costi di esecuzione di queste ultime impongono la ricerca di sistemi diagnostici alternativi che siano allo stesso tempo rapidi, economici e facilmente standardizzabili. La tecnica di MLVA analizzata in questo studio riteniamo possa rappresentare un valido strumento diagnostico specialmente nello studio di situazioni epidemiologiche complesse, come possono essere gli stabilimenti di produzione, in cui spesso diverse popolazioni della stessa specie possono convivere e contaminare gli alimenti, ma soprattutto quando vi sia la necessità di collegare tra loro diversi episodi clinici o questi alle rispettive fonti di contaminazione. MLVA si distingue per la notevole processività e per i contenuti costi di esecuzione, peraltro la tecnica è facilmente standardizzabile e riproducibile tra i laboratori garantendo la possibilità di confrontare gli isolati con un sistema univoco di interpretazione. A conferma di risultati di studi precedenti, gli stipiti di isolamento umano analizzati si concentrano all'interno di alcuni genotipi, mentre numerosi genotipi di isolamento alimentare non sembrano essere associati ad alcun episodio clinico. Non meno interessante è l'evidenza che MLVA dimostra una notevole capacità di discriminazione, consentendo di identificare diversi profili per alcuni gruppi di isolati risultati identici mediante MLST e non correlati epidemiologicamente (dati non illustrati). La disponibilità di tecniche di caratterizzazione efficienti ed economiche, come MLVA, potrà migliorare la conoscenza dell'epidemiologia di questo importante patogeno, soprattutto attraverso la condivisione delle esperienze tra laboratori e la creazione di appositi database.

BIBLIOGRAFIA

1. EFSA, 2010. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. pp. 1496.
2. Lindstedt, B.A., Tham, W., nielsson-Tham, M.L., Vardund, T., Helmersson, S. and Kapperud, G. (2008). Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Listeria monocytogenes* using multicolour capillary electrophoresis and comparison with pulsed-field gel electrophoresis typing. *J. Microbiol Methods*, 72, 141-148.
3. Orsi, R.H., Bakker, H.C. and Wiedmann, M., 2010. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int. J. Med. Microbiol.*
4. Parisi, A., Latorre, L., Normanno, G., Miccolupo, A., Fraccalvieri, R., Lorusso, V. and Santagada, G. (2010). Amplified Fragment Length Polymorphism and Multi-Locus Sequence Typing for high-resolution genotyping of *Listeria monocytogenes* from foods and the environment. *Food Microbiol*, 27, 101-108.
5. Schonberg, A., Bannerman, E., Courtieu, A.L., Kiss, R., McLauchlin, J., Shah, S. and Wilhelms, D., 1996. Serotyping of 80 strains from the WHO multicentre international typing study of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 32, 279-287.
6. Sperry, K.E., Kathariou, S., Edwards, J.S. and Wolf, L.A. (2008). Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis as a tool for subtyping *Listeria monocytogenes* strains. *J. Clin Microbiol*, 46, 1435-1450.

RINGRAZIAMENTI: Si ringraziano per la collaborazione tecnica Bulzacchelli A. e Giannico A.. Questo lavoro è stato supportato dal finanziamento del Ministero della Salute (Ricerca corrente IZSPB002/07)

Fig. 1: MLVA isolati di *Listeria monocytogenes* di origine alimentare ed umana. Valutazione mediante Minimum Spanning Tree: la dimensione degli cerchi è funzione del numero di isolati mentre il colore codifica per l'origine degli stessi.



APPLICAZIONE DELLA TECNICA MLVA NELLE STRATEGIE DI ERADICAZIONE DELLA BRUCELLOSI

Borriello G., Cozza D., Loporchio R., Valvini O., Guarino A., Galiero G.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Dipartimento di Sanità Animale, Portici (NA)

Key words: *Brucella*, MLVA

SUMMARY

Sixty-three isolates of *Brucella* spp. from cattle and water buffalo were characterized by standard methods and by MLVA analysis. The biochemical/molecular technique identified *B. abortus* bv 1 (60%), bv 3 (38%) and *B. melitensis* bv 3 (2%). MLVA analysis displayed 51 different genotypes. These data confirm the high discriminating potential of MLVA and indicate that brucellosis is still a serious problem in water buffalo and bovine herds in the Campania region, characterized by multiplicity of infection sources associated with environmental persistence of the bacterium.

INTRODUZIONE

Brucella spp. è un patogeno estremamente diffuso nell'area Mediterranea, e in particolare nell'Italia meridionale. L'infezione causata da questo microrganismo è causa di ingenti perdite economiche negli allevamenti, e, oltretutto, può essere trasmessa all'uomo attraverso il consumo di latte o prodotti lattiero-caseari contaminati, oppure attraverso il contatto diretto/indiretto con animali infetti. Le specie animali da allevamento maggiormente interessate sono quella bufalina, quella bovina e quella ovis-caprina.

Il genere *Brucella* è altamente omogeneo, con un livello di omologia del DNA superiore al 90%, e la classificazione dei ceppi microbici nell'ambito di questo genere si basa principalmente su differenze di patogenicità, preferenze di ospite, e test microbiologici convenzionali usati per la fenotipizzazione (biotyping) (2).

Recentemente, l'analisi MLVA (multiple-locus variable-number tandem repeat analysis) si è dimostrata altamente discriminante per la caratterizzazione genetica di isolati appartenenti a specie batteriche monomorfe quali *Yersinia pestis*, *Mycobacterium bovis*, *Salmonella enterica* e *Brucella* spp. (3, 4, 5, 7).

Lo scopo del presente lavoro è stato di caratterizzare mediante analisi MLVA ceppi di *Brucella* spp. di origine bovina e bufalina, isolati in diversi allevamenti della regione Campania, al fine di approfondire gli aspetti epidemiologici e di diffusione della malattia nel territorio.

MATERIALI E METODI

Ceppi batterici

Il presente studio è stato condotto su ceppi di *Brucella* spp. isolati da bovini e bufali risultati positivi alle prove sierologiche nell'ambito del piano di risanamento nazionale per la brucellosi della regione Campania, nel periodo 2008-2010. Sono stati in tal modo raccolti 63 ceppi di *Brucella* provenienti da 18 allevamenti bovini e 25 allevamenti bufalini. I ceppi sono stati isolati mediante metodo microbiologico (6). Le colonie morfologicamente simili a *Brucella* sono state identificate mediante prove biochimiche e sierologiche e successivamente tipizzate mediante PCR dal Centro di Referenza Nazionale per le Brucellosi, ubicato presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Teramo.

Estrazione del DNA batterico e caratterizzazione MLVA

Il DNA dei ceppi di *Brucella* è stato estratto mediante bollitura.

Brevemente, le colonie sono state sospese in 100 µl di acqua distillata sterile e bollite per 10 min. Dopo centrifugazione a 10.000 rpm per 5 min, il supernatante è stato prelevato ed utilizzato per le analisi successive.

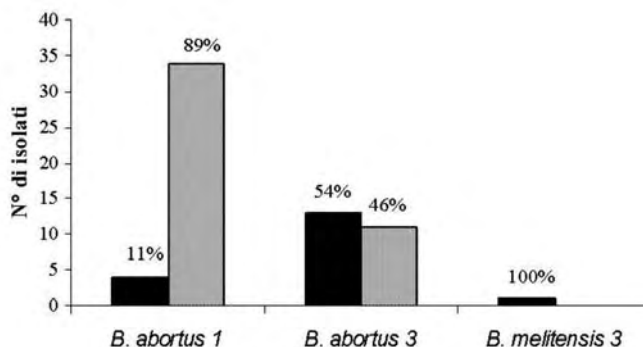
L'amplificazione del DNA batterico è stata effettuata mediante PCR in un volume finale di 25 µl utilizzando la Master Mix della Qiagen. A tale scopo sono state utilizzate sedici coppie di primers suddivise in tre gruppi (1, 3): il panel 1 (loci Bruce06, Bruce 08, Bruce11, Bruce12, Bruce42, Bruce43, Bruce45 e Bruce55), panel 2A (loci Bruce18, Bruce19 e Bruce21) e panel 2B (loci Bruce04, Bruce07, Bruce09, Bruce16 e Bruce 30). I prodotti di PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi capillare.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Durante il periodo dello studio, dal 2008 al 2010, sono stati raccolti 63 isolati di *Brucella* da linfonodi di animali, bovini e bufali, abbattuti nell'ambito del piano di risanamento della brucellosi nella regione Campania. La caratterizzazione ha identificato 38 ceppi di *B. abortus* biovar 1 (60%), 24 ceppi di *B. abortus* biovar 3 (38%) e 1 ceppo di *B. melitensis* biovar 3 (2%).

La distribuzione dei diversi biotipi nell'ambito delle specie animali in esame mostra che il biotipo *B. abortus* biovar 1 è risultato più frequente nella specie bufalina (89%); il biotipo *B. abortus* biovar 3 è risultato equamente presente in entrambe le specie (54% e 46% in bovini e bufali, rispettivamente), mentre l'unico ceppo di *B. melitensis* biovar 3 è stato isolato da un bovino (Fig. 1).

Fig. 1 – Frequenza dei biotipi di *Brucella* isolati da bovini e bufali della regione Campania



Tutti gli isolati di *Brucella* sono stati poi tipizzati mediante tecnica MLVA-16. I risultati della caratterizzazione molecolare mostrano l'esistenza di 51 diversi genotipi, confermando il grande potere discriminante di questa tecnica. Infatti, nell'ambito di ognuna delle singole specie di *Brucella* identificate, sono stati individuati numerosi genotipi MLVA diversi (Tabella 1), con un potere discriminante del 74% nel caso di *B. abortus* biovar 1 e del 92% nel caso di *B. abortus* biovar 3.

Nell'ambito dei 43 allevamenti in esame, in 32 casi è stato

isolato un unico ceppo di *Brucella*, mentre in 11 casi sono stati effettuati degli isolamenti multipli. È interessante notare che in 9 casi sono stati isolati genotipi identici di *Brucella* da allevamenti diversi, spesso molto vicini geograficamente o addirittura confinanti.

Tab. 1 – Corrispondenza tra specie di *Brucella* spp. individuate mediante metodo biochimico/molecolare e genotipi diversi individuati mediante tecnica MLVA

Specie	n. isolati	n. genotipi diversi
<i>B. abortus</i> 1	38	28
<i>B. abortus</i> 3	24	22
<i>B. melitensis</i> 3	1	1

Questo risultato suggerisce che queste aziende sono probabilmente carenti nell'applicazione delle misure di biosicurezza, ovvero sono carenti per quel che concerne i requisiti logistici, strutturali, gestionali e del personale necessari per impedire l'ingresso e la circolazione di patogeni all'interno dell'allevamento. Tra le 11 aziende dove invece è stato isolato più di un ceppo di *Brucella*, si possono osservare tre diverse tipologie di contesti. In 3 aziende sono stati isolati ceppi aventi lo stesso genotipo, o comunque genotipi estremamente simili. Le modifiche nei genotipi osservati sono causate dalla capacità intrinseca di qualunque batterio, *Brucella* inclusa, di generare mutanti nei loci codificanti ripetizioni a tandem, con una velocità di mutazione variabile. I loci inclusi nello schema MLVA utilizzato presentano infatti diverse frequenze di mutazione, e possono pertanto essere suddivisi in due grandi gruppi: il pannello 1, meno variabile, e dunque indicativo della provenienza geografica (intesa per grandi aree) del ceppo in esame; il pannello 2, invece, molto variabile, più indicativo della effettiva distanza genetica tra due o più ceppi. Tali mutazioni sono principalmente legate ai processi di replicazione in vivo, di dispersione nell'ambiente attraverso i prodotti dell'aborto, di resistenza ai fattori esterni e di re-infezione degli animali. La presenza costante nel tempo in un'azienda di ceppi geneticamente identici o solo lievemente differenti, ovvero variabili solo nei loci del pannello 2, è indicativa di una carenza dei requisiti di biocontenimento, ovvero di tutte le misure atte a limitare la diffusione dei patogeni presenti nell'allevamento al fine di impedire il contagio degli animali. In 6 aziende, invece, è stata osservata la presenza di ceppi di *Brucella* diversi tra loro, con differenze marcate, ovvero relative ad entrambi i pannelli analizzati. Questa condizione, soprattutto nei casi in cui questi isolamenti sono avvenuti in un arco temporale ristretto (c.ca un anno), sono indicativi di una molteplicità di fonti di infezione, ancora una volta ascrivibile ad una carenza dei requisiti di biosicurezza. In 2 aziende, infine, durante tutto il periodo di studio, sono stati isolati numerosi ceppi di *Brucella*, caratterizzati sia da genotipi uguali o molto simili, sia da genotipi estremamente diversi tra loro. In questo caso le aziende coinvolte sono probabilmente caratterizzate da requisiti logistico/strutturali/gestionali insufficienti a garantire la biosicurezza e il biocontenimento.

I risultati della nostra indagine, dunque, ritraggono un quadro epidemiologico ancora critico in merito alle misure di biosicurezza messe in atto per contrastare la diffusione della

brucellosi. Infatti, in primo luogo, la presenza di ceppi molto diversi in alcuni allevamenti, lascia supporre che in questi gli episodi di brucellosi sono generati da ceppi originatisi da diverse fonti di infezione. In altre aziende, la presenza di ceppi poco distanti geneticamente tra loro, può essere indicativa di infezioni reiterate nel tempo e causate da un unico ceppo che persiste nell'allevamento. La persistenza del batterio può essere causata sia da inidonee o inefficaci misure di disinfezione e di movimentazione/stabulazione degli animali, sia dall'eventuale presenza di reservoir naturali di *Brucella* spp. nell'allevamento, ovvero di animali sierologicamente negativi in grado, però, di eliminare il batterio nell'ambiente.

Gli studi sulla diversità genetica degli isolati di *Brucella* forniscono validi strumenti epidemiologici che si possono utilizzare per una più efficace azione di contrasto finalizzata all'eradicazione della malattia. Nonostante la parzialità del dato raccolto, in riferimento al numero limitato di allevamenti in studio, i risultati sono comunque significativi per gli scenari che dal punto di vista epidemiologico sono in grado di offrire.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- 1) Al Dahouk S, PL Flèche, K Nöckler, I Jacques, M Grayon, HC Scholz, H Tomaso, G Vergnaud, H Neubauer (2007) - «Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis». J Microbiol Methods. 69: 137-145.
- 2) Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM (1988) - «Techniques for the brucellosis laboratory». Paris, France, INRA.
- 3) Le Flèche P, Jacques I, Grayon M, Al Dahouk S, Bouchon P, Denoed F, Nöckler K, Neubauer H, Guilloteau LA, Vergnaud G (2006) - «Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay». BMC Microbiol. 9: 6-9.
- 4) Lowell JL, Wagner DM, Atshabar B, Antolin MF, Vogler AJ, Keim P, Chu MC, Gage KL (2005) - «Identifying sources of human exposure to plague». J Clin Microbiol. 43: 650-656.
- 5) Martinez LR, Harris B, Black WC4th, Meyer RM, Brennan PJ, Vissa VD, Jones RL (2008) «Genotyping North American animal *Mycobacterium bovis* isolates using multilocus variable number tandem repeat analysis». J Vet Diagn Invest. 20: 707-715.
- 6) OIE Manual: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2009 (Cap. 2.4.3, versione adottata a maggio 2009).
- 7) Ramiisse V, Houssu P, Hernandez E, Denoed F, Hilaire V, Lisanti O, Ramiisse F, Cavallo JD, Vergnaud G (2004) - «Variable number of tandem repeats in *Salmonella enterica* subsp. enterica for typing purposes». J Clin Microbiol. 42: 5722-5730.

CARATTERIZZAZIONE DI MOLLUSCHI BIVALVI *LITOPHAGA LITOPHAGA* (DATTERI DI MARE): ANALISI DI CONTAMINANTI ED OLIGOELEMENTI NEI DIVERSI COMPARTI BIOLOGICI

Chiaravalle A. E.¹, Bisceglia D.², Miedico O.¹, Laconca L.¹, Pompa C.¹, Tarallo M.¹, Ferrara A.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia

²ASL-FOGGIA Servizio Veterinario - Distretto di Manfredonia

Key words: Datteri di mare, metalli pesanti, DRC-ICP-MS

SUMMARY

A survey on the incidence of 18 metals in samples of bivalve molluscs was obtained using an existing method validated and optimized based on a micro-wave mineralization followed by analysis with Inducted coupled plasma mass spectrometry (ICP/MS) with dynamic cell reaction (DRC). The specimens were divided in four different parts (muscle, stomach, liver-pancreas and bowels) and considering the different lengths which is connected to the age to better understand the bio-characteristic of this specie and the capability of absorption of the considered metals.

INTRODUZIONE

Il dattero di mare (*Litophaga litophaga*) è un bivalve dimiario, eteromiario, perforatore, di cui è vietata la raccolta, la commercializzazione ed ogni forma di importazione su tutto il territorio nazionale (DM 16/10/1998). Benché privo di interesse nutrizionale, esso si presta ad essere considerato un interessante oggetto di indagini scientifiche non solo per la capacità di filtrazione e bio-accumulo comune a tutti i M.E.L. (molluschi eduli lamellibranchi), ma soprattutto per la caratteristica longevità e stanzialità che lo rendono un ottimo bioindicatore. Infatti sono stati trovati individui di oltre 50 anni, in base al conteggio delle linee di accrescimento annuali lungo la sezione longitudinale del guscio¹.

A causa del divieto nazionale di commercializzazione e della difficoltà intrinseca della raccolta, la letteratura scientifica internazionale non è ancora approdata ad un grado di conoscenza approfondito riguardo la peculiarità biologiche di questo mollusco. Pertanto, per dare un valido contributo in tale direzione, è stato condotto il presente lavoro di caratterizzazione dei datteri di mare riguardo al contenuto di 18 elementi (sia contaminanti che oligoelementi) su diversi compartimenti biologici (muscolo detrattore delle valve – stomaco – epatopancreas - resto dei visceri).

MATERIALI E METODI

Campioni analizzati: per lo studio di caratterizzazione è stata analizzata una partita di datteri di mare pescata nel golfo di Manfredonia e sottoposta a sequestro giudiziario da parte del Servizio Veterinario ASL-FG. L'intera partita, costituita da 231 esemplari (circa 3,0 kg in totale), è stata suddivisa in 4 gruppi in base alla lunghezza e di conseguenza in base all'età. In particolare, 34 esemplari da 3 a 5 cm; 80 esemplari tra 5,1 a 6,0 cm; 85 esemplari da 6,1 a 6,5 cm e 32 esemplari da 6,6 a 8,0 cm. Le analisi chimiche, sono state eseguite presso la Struttura Complessa CHIMICA dell'IZS di Foggia. Allo scopo è stato utilizzato un metodo validato e accreditato, opportunamente modificato.

Preparazione dei campioni: per ciascun esemplare di dattero di mare sono stati separati i diversi compartimenti biologici (muscoli detrattori delle valve, stomaco, epatopancreas e visceri), riuniti in base al gruppo di appartenenza, per formare 16

campioni globali (4 compartimenti per 4 gruppi). Ciascun campione è stato infine omogeneizzato e una aliquota (1,0 grammi con accuratezza di 0,1 mg) è stata mineralizzata in forno a microonde (modello ETHOS-ONE della Milestone) con 8 ml di acido nitrico (HNO₃) e 2 ml di acqua ossigenata (H₂O₂).

Determinazione Strumentale: la soluzione mineralizzata, diluita ad un volume noto con Acqua UltraPura, è stata sottoposta a determinazione strumentale mediante uno Spettrometro di Massa al plasma induttivamente accoppiato, (ICP-MS, Modello Elan DRC II della PerkinElmer).

Sono stati analizzati 18 elementi in totale, divisi tra metalli pesanti (Mercurio, Piombo, Cadmio, Arsenico, Cromo, Uranio e Nichel) ed oligoelementi (Cobalto, Molibdeno, Selenio, Rame, Zinco, Vanadio, Ferro, Calcio, Alluminio, Stronzio e Manganese). La determinazione strumentale è stata eseguita mediante calibrazione esterna, con standard acquosi acidificati al 2% di HNO₃, con range di taratura specifico per ciascun elemento in base al livello di concentrazione presunto. Le interferenze isobariche, tipiche di questa tecnica analitica in particolar modo per alcuni elementi (es: Cromo, Arsenico, Ferro, etc...) sono state eliminate con la Cella Dinamica di Reazione, un dispositivo che consente di trattare i cationi formati nel plasma di argon con un opportuno gas reattivo, per scomporre ed abbattere selettivamente le interferenze isobariche dovute a ossidi, argidi, cloruri,... In particolare è stato adoperato il Metano (grado di purezza al 99,9999%) per la determinazione del Selenio e l'Ammoniaca (anidra al 100%) per Arsenico, Ferro, Nichel, Rame, Zinco, Alluminio, Vanadio e Manganese.

La qualità dei risultati è stata garantita mediante l'utilizzo di opportuni Materiali Certificati (NIST 1566b Oyster Tissue e ERM CE278 Mussel Tissue). L'analisi per ogni campione globale è stata eseguita in doppio, verificandone la ripetibilità.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati sulla concentrazione dei diversi analiti in tutto il mollusco (concentr. totale) riportati in Tabella 1 mostrano che non vi è una significativa differenza dovuta all'età (e quindi alla grandezza longitudinale dei gusci) dei datteri di mare. Tuttavia, considerando più in dettaglio i singoli compartimenti biologici, si può osservare che la concentrazione di alcuni elementi tende ad aumentare al crescere della lunghezza del mollusco. Ad esempio per i metalli pesanti Uranio, Cromo e Mercurio, nel comparto epatopancreas si nota un andamento crescente, probabilmente proprio a causa della maggiore longevità degli esemplari più grandi.

Ciò che emerge con forza è la differenza dei tenori della maggior parte degli elementi nei diversi compartimenti biologici: infatti l'epatopancreas e i visceri mostrano concentrazioni molto più elevate rispetto ai compartimenti stomaco e soprattutto muscolo. Ad esempio il piombo nell'epatopancreas ha una concentrazione 6 e 10 volte maggiore che nello stomaco e nel muscolo, rispettivamente. Il mercurio e il cadmio mostrano un

	U	Hg	Pb	Cd	Cr	Mo	Co	Ni	Se	As	Cu	V	Sr	Ca	Zn	Mn	Fe	Al
	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)	(µg/g)	(µg/g)	(µg/g)	(µg/g)	(µg/g)	(µg/g)	(µg/g)	(µg/g)	(µg/g)
Concentr. totale Gr. A	32,7	19,3	408	170	322	256	366	787	430	8,82	2,63	1,55	11,33	1414	31,5	12,0	87,0	86,5
Concentr. totale Gr. B	36,6	18,8	404	162	308	267	346	769	366	7,43	2,24	1,56	9,44	915	30,5	12,1	82,5	82,4
Concentr. totale Gr. C	32,7	20,6	385	218	454	291	369	857	375	7,96	2,69	1,56	13,38	1294	32,7	10,8	82,4	82,0
Concentr. totale Gr. D	30,8	19,8	444	188	385	266	361	872	365	8,05	1,81	1,79	9,28	774	32,1	10,3	83,8	90,0
Gruppo A muscolo	4,75	5,72	58,2	66,5	45,3	46,5	88,9	261	125	3,49	0,75	0,11	2,87	272	10,5	4,00	9,04	9,74
Gruppo B muscolo	4,62	4,80	61,8	72,6	55,9	47,9	79,9	234	102	2,84	0,65	0,09	2,69	206	9,7	3,80	7,73	8,05
Gruppo C muscolo	2,99	5,01	44,2	75,8	67,7	38,8	65,7	184	106	2,92	0,52	0,07	3,25	276	8,8	3,22	6,62	7,19
Gruppo D muscolo	3,52	5,01	69,4	72,4	73,0	36,5	63,0	210	113	2,76	0,53	0,07	3,03	257	9,1	3,31	9,22	11,53
Gruppo A stomaco	9,50	8,18	118,0	94,0	111,2	114,1	165,7	406	194	5,38	1,11	0,40	4,09	332	16,9	5,24	18,0	17,8
Gruppo B stomaco	12,05	10,04	122,4	102,3	83,9	129,8	175,8	442	192	4,59	1,03	0,39	5,79	452	15,6	4,90	17,0	17,2
Gruppo C stomaco	11,12	8,95	123,7	115,4	122,5	111,8	141,9	390	187	4,64	0,90	0,40	5,58	431	18,0	4,77	21,8	23,1
Gruppo D stomaco	7,86	8,04	96,4	88,8	86,9	89,8	118,7	345	161	4,47	0,75	0,32	5,03	293	14,6	3,13	12,6	12,9
Gruppo A epatopancr	36,9	23,6	627	190	404	462	497	866	561	9,03	2,55	4,64	7,64	830	45,0	8,91	148	134
Gruppo B epatopancr	47,2	24,2	564	176	424	432	440	837	478	6,34	1,96	4,88	7,76	782	44,3	7,32	152	143
Gruppo C epatopancr	48,3	27,2	593	237	512	500	502	965	470	8,51	1,98	5,05	10,10	925	47,6	7,45	148	143
Gruppo D epatopancr	51,9	30,5	578	216	576	537	530	996	465	8,72	2,09	6,36	8,19	692	48,5	6,36	164	170
Gruppo A visceri	41,4	22,5	443	198	383	236	403	931	482	10,40	3,34	0,75	16,11	2129	32,6	16,3	90,8	96,1
Gruppo B visceri	44,6	21,4	475	188	367	270	399	925	413	9,51	2,98	0,69	12,38	1229	32,3	17,8	83,9	87,4
Gruppo C visceri	36,3	23,1	419	255	568	292	417	1023	422	9,25	3,69	0,76	17,90	1784	34,1	14,6	83,6	84,3
Gruppo D visceri	33,1	21,1	536	219	438	250	405	1049	416	9,41	2,16	0,84	11,53	992	34,0	14,4	84,8	93,4

Tabella 1: Concentrazione totale e per comparti biologici di 18 elementi nei 4 gruppi di datteri di mare. Ogni dato analitico è affetto da una incertezza del 13%

accumulo da 3 a 5 volte maggiore nei comparti epatopancreas e visceri; molibdeno, cobalto e nichel hanno una concentrazione paragonabile nei due comparti epatopancreas e visceri, molto più elevata che nel muscolo e nello stomaco. Invece per l'arsenico e soprattutto per il rame tale fenomeno, pur riscontrabile, non è così marcato (fattore di accumulo pari a 2 o 3). Si può notare inoltre che alluminio, ferro e zinco si concentrano in particolar modo nell'epatopancreas, mentre stronzio, calcio e manganese sono presenti maggiormente nei visceri. Tutte queste differenziazioni possono essere attribuite al ruolo biologico dei tessuti analizzati, dei quali muscolo e stomaco rappresentano comparti poco attivi e di transito, contrariamente all'epatopancreas che possiede una intensa attività secretoria e di assorbimento.

Un'attenzione particolare va rivolta al Vanadio, riscontrabile quasi esclusivamente nell'epatopancreas. I dati ottenuti mostrano come i livelli di questo elemento siano simili a quelli riscontrati da precedenti studi condotti nei laboratori dell'IZS di Foggia sulla matrice ascidie (*Microcosmus sulcatus*, meglio conosciuto come taratuffo o uovo di mare), dove si registra un tenore medio di Vanadio di 1,58 mg/kg. In questo particolare organismo marino il Vanadio costituisce il gruppo prostetico di un pigmento respiratorio: l'*emovanadina*. Verosimile dunque che questa proteina coniugata in sede epatica possa svolgere non solo funzione ossiforica ma anche di "O₂ binding" in grado di far fronte a periodi di ipossia².

E' infine interessante confrontare da un punto di vista strettamente tossicologico questa particolare specie ittica con

specie simili commerciabili e diffusamente presenti nella dieta umana, ovvero mitili, ostriche e vongole³. Presso la Struttura Complessa CHIMICA del suddetto IZS ogni anno vengono effettuati centinaia di controlli ufficiali su tali tipologie di matrice in merito al contenuto di Mercurio, Piombo e Cadmio, regolamentati dal Reg CE 1881/2006 e s.m.i. In particolare dai dati raccolti nel 2° semestre 2010 e 1° semestre 2011 sui molluschi provenienti dalle coste pugliesi dal lago di Lesina fino a Trani, è possibile definire un tenore medio di questi contaminanti, riportati in Tabella 2:

	Mercurio	Piombo	Cadmio
Cozze	0,014	0,178	0,173
Ostriche	0,012	0,142	0,215
Vongole	0,009	0,128	0,104

Tabella 2: Distribuzione media in mg/kg di Mercurio, Piombo e Cadmio nei molluschi cozze ostriche e vongole pescate nelle acque del golfo di Manfredonia (luglio 2010-giugno 2011)

Premesso che i dati sui molluschi commerciabili sono rassicuranti da un punto di vista tossicologico, in quanto ben al di sotto dei limiti di legge, pari a 0,5, 1,5 e 1,0 per Hg, Pb e Cd rispettivamente, a testimonianza del buono stato di salute dell'ambiente marino del basso Adriatico, emergono alcune

differenze con la tipologia di molluschi in esame. In particolare, il tenore medio di Mercurio, pur rimanendo ben al di sotto della soglia di allerta tossicologica, è quasi il doppio rispetto alle tre tipologie citate; inoltre il piombo è da 3 a 4 volte più concentrato. Invece praticamente comparabile è la concentrazione di cadmio, se si esclude la matrice vongole, mediamente poco contaminate da questo metallo. Ciò potrebbe in prima battuta essere attribuito alla maggiore longevità dei datteri di mare (nel corso della vita filtrano una maggiore quantità di acqua e di xenobiotici), o anche a proprietà fisiologiche peculiari di questo mollusco.

CONCLUSIONI

Data la limitata conoscenza e l'esiguo numero di lavori scientifici sulla specie ittica *Lithophaga lithophaga*, è stato condotto uno studio di caratterizzazione dettagliato dei tenori di metalli pesanti ed oligoelementi, su una partita di datteri di mare. E' emersa da un lato una sostanziale indifferenziazione in base all'età, dall'altro livelli di accumulo più o meno elevati nei vari comparti biologici. Inoltre, gli organi maggiormente interessati dal fenomeno del bioaccumulo sono epatopancreas e visceri, il primo in quanto sede di attività secretorie e di assorbimento,

il secondo (rappresentato per lo più da branchie, nefridi e gonadi) in quanto sede di attività di filtrazione e di escrezione. Infine, pur rimanendo ben al di sotto della soglia di allerta tossicologica definita per legge sui molluschi commerciabili, si registra un tenore maggiore di Hg e soprattutto Pb, rispetto alle matrici mitili, vongole ed ostriche. Reputiamo tale studio un ottimo punto di partenza per indagini future, volte ad una maggiore conoscenza di questi particolari organismi marini.

BIBLIOGRAFIA

1. Galinou-Mitsoudi S., Sinis A.I. (1995) Age and growth of *Lithophaga lithophaga* (LINNAEUS, 1758) (Bivalvia: Mytilidae), based on annual growth lines in the shell, Journal of Molluscan studies, Vol 61, Issue 4, pag:435-453
2. Dieter Rehder, Biorganic Vanadium Chemistry, pag 90 – WILEY (Ed 2008)
3. AUSL Rimini, Unità Operativa Igiene Alimenti di origine Animale - I rischi per la salute legati al consumo dei molluschi eduli lamellibranchi.

OTTIMIZZAZIONE E VALIDAZIONE DI UN METODO GC/ECD PER LA DETERMINAZIONE DI NDL-PCBs IN PRODOTTI ITTICI

Nardelli V., Casamassima F., Cristino M., Gesualdo G.,

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata
Via Manfredonia 20 – 71121 Foggia*

Key words: Fish, NDL-PCBs, GC/ECD

ABSTRACT

NDL-PCBs are widespread contaminants with important implications for environmental and human health. The method, already applied to mussels, has been also employed to fish samples with minor changes. The procedure involves sample treatment by n-hexane, concentrated sulphuric acid and ENVI-carb, then purification on SPE PCB and detection by GC/ECD. This method shows high recoveries and all validation parameters (i.e. linearity, precision, LOD, LOQ, and repeatability) are below the reference values.

INTRODUZIONE

Il pesce è ritenuto dagli attuali nutrizionisti e dietologi componente essenziale della dieta mediterranea, in quanto fonte di proteine di elevato valore biologico, di sali minerali e di vitamine e pertanto costituisce una valida alternativa agli altri alimenti proteici di origine animale anche per la facile digeribilità attribuibile alla percentuale di acqua compresa tra il 75 e l'80%. Questo è un alimento da assumere regolarmente ma negli ultimi anni la fiducia del consumatore è stata minata dalle continue notizie di rischi da esposizione alimentare per ingestione di prodotti ittici contaminati da PCBs. Pertanto nei prodotti alimentari che rivestono un ruolo chiave nell'alimentazione umana, quali appunto i prodotti ittici è assolutamente necessario effettuare controlli sul grado di contaminazione al fine di ridurre un ipotetico rischio sanitario. E' di fondamentale importanza inoltre, per la salute pubblica, monitorare tali contaminanti e poterne identificare l'origine, in considerazione anche del crescente interesse per l'acquacoltura unitamente all'uso alquanto diffuso delle più moderne tecniche di allevamento intensivo. I PCBs annoverati tra i contaminanti più pericolosi per la salute umana, sono stati troppo spesso impropriamente utilizzati nell'industria come, isolanti, lubrificanti e plastificanti. Essi sono sostanze organiche estremamente persistenti nei vari comparti ambientali, che tendono a bioaccumularsi nella catena alimentare favorendo la mutagenesi nell'uomo ed esplicando la loro azione a livello del sistema riproduttivo ed endocrino. A tutt'oggi, purtroppo, a livello europeo non sono stati fissati per i NDL-PCBs i limiti massimi nei vari tipi di alimenti ed inoltre l'EFSA (European Food Safety Authority) ha fornito solo valori consigliabili ed in particolare, il valore somma dei 6 congeneri per le diverse specie ittiche è compreso nell'intervallo di 75-300 ng/g di prodotto intero. In questo studio, il metodo analitico già applicato per la determinazione dei 6 congeneri di NDL-PCBs (PCB 28-52-101-138-153-180) (2,3), in campioni di mitili è stato ottimizzato per le matrici ittiche di diversa tipologia e provenienza e sono stati valutati i principali parametri di validazione al fine di verificarne l'applicabilità alla nuova matrice.

MATERIALI E METODI

E' stata messa a punto una procedura adeguata di estrazione del grasso dai campioni mediante Soxhlet, metodo suggerito dal CRL (Community Reference Laboratory) per la ricerca dei pesticidi negli alimenti e contemplato nella Norma UNI EN 1528-2.

Nel campione di pesce si eliminano lische e pelle e si separa la parte edibile, che viene omogeneizzata e processata con il seguente metodo: si pesano 5 g di campione, a cui si aggiungono 80 ml di n-esano in una beuta con tappo e si lascia in estrazione l'intera notte. Si vortica su agitatore magnetico per 90 minuti e successivamente si sonica per 30 minuti. Si separa il surnatante e si riduce a piccolo volume (4 ml) in Turbopap, quindi si aggiungono 0,1 g di ENVI-carb e si vortica nuovamente. Si aggiungono 4 ml di acido solforico al 90% , si vortica e successivamente si centrifuga a 3000 rpm per 20 minuti alla temperatura di 15-20 °C e si lascia decantare per 30 minuti. Si preleva il surnatante limpido, si riduce a secco totale in Turbopap alla temperatura di 45°C. Si riprende il residuo con 2 ml di n-esano, si purifica su colonnina SPE PCB, preventivamente condizionata con 3 ml di n-esano e si eluisce con 10 ml di n-esano. Si porta a secco totale in Turbopap alla temperatura di 45°C; si riprende con 0,9 ml di isottano a cui si aggiungono 0,1 ml di PCB 209 (Standard Interno di siringa) alla concentrazione di 100 ng/ml e si inietta in GC/ECD (fattore di correzione=5).

CONDIZIONI STRUMENTALI

L'analisi in GC/ECD è stata condotta mediante un sistema gascromatografico Perkin Elmer mod. Autosystem XL accoppiato ad un rivelatore a cattura di elettroni. Il campione viene iniettato in un iniettore del tipo PTV operante in isoterma. Per la separazione cromatografica è stata utilizzata una colonna capillare Varian Factor Four VF-5ms (30m x 0.25mm i.d. x 0.25mm). Le condizioni strumentali sono schematizzate in Tab.1

Tab.1 Condizioni GC/ECD

Temperatura dell'iniettore	250°C
Iniezione 1 µl	modalità split/splitless
Programmazione del Forno	T ₁ =130°C; Hold ₁ =0,0 min; Rate ₁ =5°C/min; T ₂ = 190°C; Hold ₂ =0,0min; T ₃ = 280°C; Hold ₃ =14,0min.
Carrier gas	Elio (99,999%) - 1 ml/min
Gas make-up	Azoto (99,999%) - 40 ml/min
Temperatura del rivelatore (ECD)	375°C
Durata della corsa	35,0 min

La valutazione qualitativa della eventuale presenza degli analiti in esame, riscontrata all'analisi in GC/ECD, avviene mediante il confronto fra i tempi di ritenzione dei picchi, se presenti, con i tempi di ritenzione delle soluzioni standard, analizzate nelle stesse condizioni sperimentali. La valutazione quantitativa è stata effettuata con il metodo della standardizzazione interna.

Ottimizzazione del metodo

E' stata verificata l'applicabilità della procedura di estrazione

del grasso, indicata dal costruttore, alla tipologia dei campioni in esame, apportando le opportune modifiche alla scelta del solvente e ai tempi di estrazione. Pertanto sono state eseguite prove di ripetibilità ($n=12$) su uno stesso campione di salmone fresco riscontrando un contenuto medio % di lipidi pari a 11,70 confrontabile con i valori riportati in letteratura (5) nonché buoni valori di Deviazione Standard (0,11) e CV% (0,91).

Le variabili ottimizzate in questo metodo sono l'aumento del volume di solvente estraente e del tempo di estrazione unitamente all'inserimento delle colonnine SPE PCB a letto misto (benzensolfoniche/silice). In particolare l'utilizzo di tali colonnine offre un'eccellente riproducibilità ed aumenta la selettività degli stessi analiti, oltre al vantaggio che la procedura di purificazione viene condotta con successo con un unico solvente.

PRESTAZIONE DEL METODO

La validazione e l'analisi quantitativa dei risultati sono state effettuate mediante l'utilizzo di materiali di riferimento certificati (Dr. Ehrenstorfer-GmbH). I parametri di prestazione del metodo messo a punto, quali l'accuratezza, la precisione, la linearità strumentale, il limite di determinazione (LOD) il limite di quantificazione (LOQ), la specificità e la robustezza sono stati determinati per tutti gli analiti. I valori di LOQ e LOD strumentali (ng/ml) ed in matrice (ng/g) sono riportati in Tab.2

Tab.2 Valori LOD e LOQ

ANALITI	LOD Strumentale	LOQ Strumentale	LOD in matrice	LOQ in matrice
PCB 28	0,03	0,09	0,17	0,50
PCB 52	0,11	0,33	0,07	0,21
PCB 101	0,11	0,35	0,17	0,53
PCB 153	0,10	0,32	0,15	0,45
PCB 138	0,08	0,25	0,19	0,60
PCB 180	0,06	0,19	0,37	1,10

E' stata verificata, così come indicato nelle Linee Guida degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (II.ZZ.SS.), (1) la linearità delle curve di taratura di ogni analita, risultate lineari nell'intero intervallo di concentrazioni esplorate (2,50-50,0 ng/ml), valutate mediante l'utilizzo di Software applicativo Unichim per l'elaborazione dei risultati analitici ottenendo un valore di $R^2 \geq$ di 0,99 per tutti gli analiti.

Le sedute analitiche di precisione sono state eseguite in giorni diversi e con operatori diversi sullo stesso campione di pesce (spigola) in modo che la variabilità dei risultati fosse influenzata dal maggior numero di fattori possibile. Ciascuna seduta analitica è stata quantificata a fronte di una retta media di riferimento a 5 punti (2,5-5,0-12,5-25,0-50,0 ng/ml).

Per lo studio del recupero sono stati analizzati sei replicati a 3 livelli di fortificazione (1-2,5-5 ng/g) in base al fattore di concentrazione della metodica. Il recupero medio relativamente al valore somma dei 6 congeneri di NDL-PCBs è pari al 72,07 % e pertanto rientra nel range consigliato dalla Sanco (4). Inoltre anche i valori di CV% dei campioni additivati ai vari livelli risultano inferiori sia a quelli di riferimento calcolati con l'equazione di Thompson (7) sia a quelli previsti nella Sanco. Per quanto concerne le prove di specificità sono stati analizzati 20 bianchi campione, processati indipendentemente e scelti in base alla rappresentatività prevista dal Piano Nazionale Residui (PNR) e in base alla numerosità dei campioni pervenuti ed analizzati in laboratorio.

Le prove sperimentali di robustezza, eseguite secondo l'approccio

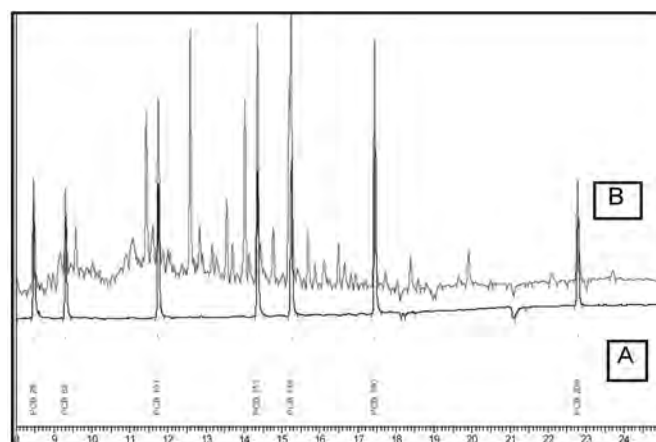
di Youden, sono state effettuate esclusivamente in condizioni di variazioni lievi, secondo quanto riportato nelle Linee Guida degli II.ZZ.SS.

RISULTATI E DISCUSSIONE

La concentrazione dell'acido solforico pari al 90% riveste un ruolo importante nella degradazione della matrice organica e del grasso, in quanto determina la completa eliminazione degli interferenti lasciando inalterati gli analiti di interesse (2). Nell'analisi in GC/ECD, tecnica altamente sensibile, selettiva e specifica, è stata di rilevante importanza la preconcentrazione del campione (fattore 5) così da garantire la determinazione dei NDL-PCBs a livello di tracce.

In Fig.1 è riportato l'overlay di un cromatogramma degli standard dei 6 congeneri di NDL-PCBs (A) e quello di un campione reale additivato a 5 ng/g (B).

Fig.1 Overlay cromatogrammi



CONCLUSIONI

Il metodo multiresiduale messo a punto per la determinazione analitica di NDL-PCBs è risultato robusto e specifico per le matrici analizzate, nonché versatile in quanto applicabile sia ai mitili che ai prodotti ittici. La semplicità ed efficacia nell'esecuzione lo rendono idoneo all'attività di routine dei laboratori.

La procedura di estrazione-purificazione descritta, consente l'eliminazione dell'effetto matrice nonché degli eventuali interferenti nell'intorno dei tempi di ritenzione dei singoli congeneri analizzati, riducendo notevolmente i tempi di analisi, con buoni valori di recupero, ripetibilità, LOD e LOQ, in accordo con i regolamenti della Commissione Europea.

BIBLIOGRAFIA

1. Linea Guida per la validazione intra-laboratorio di metodi di prova di conferma in accordo con la Decisione 2002/657/CE
2. Nardelli V., et al. "Rapid multiresidue extraction method of organochlorinated pesticides from fish feed" J. Chromatography A, 1034 33-40 (2004)
3. Nardelli V., et al "Messa a punto di metodi GC/ECD e GC/MS tandem per la determinazione di PCBs nei mitili" Atti X Congresso CISETA (2011)
4. SANCO Document N° 19684/2009
5. Souci et al. "Food composition and Nutrition tables (89/90) 4th Ed.
6. Tecator Application Note AN67/83
7. Thompson M., Analyst 125 385 (2000)

Gli autori ringraziano per la valida collaborazione tecnica i Sig.ri Anna Calitri e Domenico Praino.

POSTERS

STUDIO EPIDEMIOLOGICO SULLA SIEROPREVALENZA DI BRUCELLA MELITENSIS E BRUCELLA ABORTUS NEL CANE

Adone R. ¹, Di Prisco F. ², D'Alessio N. ², Tamburro C. ², Francia M. ¹, Pasquali P. ¹, Guarino A.

¹ Department of Veterinary Public Health and Food Safety, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy.

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Sezione di Avellino, Italy

Keywords: Brucellosis, dogs,

INTRODUZIONE

La brucellosi nel cane è causata nella maggior parte dei casi da *B. canis*; tuttavia, sono possibili anche infezioni con *B. melitensis* (da ovi-caprini), *B. abortus* (da bovini) o *B. suis* (da suini), a seguito del contatto di questo animale con materiale contaminato come invogli fetali e secrezioni vaginali, latte o carne contaminati. Generalmente l'infezione è sporadica e autolimitante. Recentemente però, l'idea che il cane rappresenti un ospite terminale è stata messa in discussione, e il suo ruolo, come serbatoio ma anche come possibile vettore non solo meccanico dell'infezione, è sempre più oggetto di studio.

Obiettivo del presente lavoro è stato effettuare una indagine sierologica preliminare su un numero significativo di cani provenienti da allevamenti bovini e ovi-caprini, sia infetti che ufficialmente indenni, e da canili privati, al fine di ottenere indicazioni utili per uno studio sul ruolo epidemiologico del cane nelle brucellosi dei ruminanti.

L'aspetto più significativo della ricerca è da ricercare nell'elevata sieroprevalenza riscontrata nei cani testati alla brucellosi. I dati confermano l'elevata esposizione del cane alla brucellosi dei ruminanti e suggeriscono il possibile ruolo di "sentinella" che questo animale può svolgere.

Il cane potrebbe essere assimilato epidemiologicamente ai "portatori latenti" responsabili dei c.d. ritorni ciclici della malattia.

SUMMARY

In dogs, Brucellosis is mostly caused by *B. canis*; however infections are also possible by *B. melitensis* (sheep and goat), *B. abortus* (cattle) or *B. suis* (pig) The infection occurs after contact with contaminated material namely fetal placenta, vaginal secretions, milk or meat. Usually the infection is sporadic and self-limiting. However, recently, it has been debated whether the dog represents the terminal host. Thus its role as a reservoir and also as a possible vector of infection is increasingly object of interesting studies.

The aim of this research is to provide a preliminary serological survey of a significant number of dogs from infected breeding and non-infected breeding and from dog pound as well, in order to obtain epidemiological information about the role of the dog in ruminant brucellosis.

The most significant aspect of this research is the high serum prevalence found in dogs tested. Data confirm the high exposure of the dog to brucellosis in ruminants and suggest the possible role of the dog as a sentinel. The dog could be thus compared to the latent carriers responsible for cyclic return of the disease.

MATERIALI E METODI

Per lo svolgimento di questa ricerca sono stati analizzati 144 campioni di sangue di cane prelevati da 12 allevamenti ufficialmente indenni, da 25 allevamenti infetti e da 2 canili.

I campioni sono stati sottoposti alle prove diagnostiche convenzionali SAR ed FdC-mi, entrambi eseguiti con antigene ufficiale *B. abortus* 99, e al test complementare ELISA. Alcuni campioni sono stati ulteriormente esaminati con il test di Polarizzazione di Fluorescenza (FPA), la cui affidabilità è stata recentemente confermata dall'EFSA, ma che è ancora poco usato con i sieri di cane.

La SAR è un test rapido che utilizza un antigene acido a pH 3,5 colorato con rosa bengala: è un test di screening, semplice, economico e sensibile. La FdC è un test individuale di conferma; esso permette di qualificare gli animali infetti in base alle unità sensibilizzanti il complemento per millilitro.

Entrambi i test devono essere eseguiti come descritto negli allegati al DM n.453/92 e DM n. 651/94.

L'ELISA è un test sierologico immunoenzimatico. Il principio della reazione è basato sulla messa in evidenza di anticorpi specifici presenti in un siero mediante un antigene brucellare fissato alla fase solida (piastre microtiter) con un siero policlonale o monoclonale o passivamente.

L'FPA è un test semplice e rapido e può essere eseguito al di fuori del laboratorio. Si basa sulla variazione di polarizzazione di un'emissione fluorescente e l'interpretazione è oggettiva.

RISULTATI E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti sono stati confrontati ed elaborati.

Per quanto riguarda i risultati della SAR si nota come negli allevamenti infetti, su 79 campioni esaminati 33 sono risultati positivi (41,8%) mentre 46 non hanno dato reazione (58,2%). Negli allevamenti ufficialmente indenni, invece, su 25 campioni esaminati, 24 sono risultati negativi (96%) mentre uno solo ha dato esito positivo (4%). I risultati della FdC indicano che negli allevamenti infetti, su un numero totale di 65 campioni esaminati, 19 sono risultati positivi (24%), mentre 46 hanno dato esito negativo (58,2%). I rimanenti 14 campioni (17,8%) hanno mostrato un forte PA che non è stato possibile eliminare e che ha reso il risultato aspecifico e quindi non utilizzabile. I risultati ottenuti con la FdC negli allevamenti indenni sono analoghi a quelli della SAR: su 25 campioni esaminati, 24 sono risultati negativi (96%) e uno solo positivo (4%).

Al test ELISA, nessun campione proveniente da allevamenti infetti è risultato positivo, mentre tutti i campioni provenienti da allevamenti indenni sono risultati negativi.

Per quanto riguarda i sieri prelevati a cani appartenenti a canili privati, su 40 soggetti esaminati, 2 campioni (5%) sono risultati positivi sia alla SAR che alla FdC, ma non alla ELISA, mentre 38 (95%) sono risultati negativi in tutte e tre le prove. Sei campioni hanno mostrato un forte PA (potere anticomplementare).

Come si vede dai risultati sierologici, la SAR ha fornito una percentuale più alta di positività rispetto alle altre prove.

I risultati ottenuti con la FPA su un numero ancora limitato di campioni, hanno indicato un discreto grado di concordanza.

Tuttavia, perché questo test possa essere preso in considerazione come prova da affiancare alle metodiche già in uso grazie alla sua facilità di esecuzione, sensibilità e velocità, è necessaria una più accurata messa a punto per un migliore adattamento della tecnica alla natura particolare dei sieri di cane.

I risultati ottenuti confermano che SAR ed FdC sono metodiche valide per la diagnosi individuale e di massa della brucellosi nel cane. Tuttavia, a causa di una alta percentuale di reazioni aspecifiche, dovute al frequente fenomeno del potere anticomplementare mostrato da questi sieri, soggetti verosimilmente infetti possono sfuggire allo screening sierologico. Sarebbe quindi opportuno che le due reazioni venissero eseguite parallelamente, specialmente negli allevamenti risanati o indenni dove la sorveglianza deve essere più rigorosa possibile.

L'aspetto più significativo della ricerca è da ricercare nell'elevata sieroprevalenza riscontrata nei cani testati alla brucellosi. I dati confermano l'elevata esposizione del cane alla brucellosi dei ruminanti e suggeriscono il possibile ruolo di "sentinella" che questo animale può svolgere.

Il cane potrebbe essere assimilato epidemiologicamente ai "portatori latenti" responsabili dei c.d. "ritorni ciclici" della malattia in quegli allevamenti ritenuti risanati ed ufficialmente indenni e potrebbe essere responsabile della contaminazione ambientale che è un elemento fondamentale nella trasmissione di questa zoonosi. Poiché non si è potuto identificare il tipo di *Brucella* responsabile della malattia, i dati ottenuti dovrebbero costituire il punto di partenza di una indagine supplementare di natura microbiologica e biomolecolare. Tale approfondimento consentirebbe di confermare il ruolo del cane non solo come serbatoio ma anche come possibile eliminatore attivo di brucelle in particolare durante il parto, come avviene nei ruminanti, e suggerirebbe l'adozione di specifiche misure di profilassi rivolte ai cani presenti negli allevamenti infetti.

BIBLIOGRAFIA

1. Carmichael, L.E. *Brucella canis*. In: Nielsen K, Duncan JR. , editors. *Animal Brucellosis*. Boca Raton: CRC Pr; 1990. pp. 335–350.
2. Moreno, E; Cloeckaert, A; Moriyon, I. *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol*. 2002;90:209–227
3. Carmichael, L.E; Kenney, R.M. Canine brucellosis: The clinical disease, pathogenesis, and immune response. *J Am Vet Med Assoc*. 1970;156:1726–1734.
4. Alton, G. G., L. M. Jones, R. D. Angus, and J. M. Verger. 1988. *Techniques for the brucellosis laboratory*, p. 63. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France.
5. Biancifiori, F., F. Garrido, K. Nielsen, L. Moscati, M. Duran, and D. Gall. 2000. Assessment of a monoclonal antibody-based competitive enzyme linked immunoassay (CELISA) for diagnosis of brucellosis in infected and Rev-1 vaccinated sheep and goats. *Microbiologica* 23:399-406.
6. Blasco, J. M., B. Garin-Bastuji, C. M. Marin, G. Gerbier, J. Fanlo, M. P. Jimenez De Bagues, and C. Cau. 1994. Efficacy of different rose Bengal and complement fixation antigens for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Vet. Rec.* 134:415-420.
7. Diaz-Aparicio, E., C. Marin, B. Alonso-Urnameta, V. Aragon, S. Pérez-Ortiz, M. Pardo, J. M. Blasco, R. Diaz, and I. Moriyon. 1994. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Brucella melitensis* Infection of goats. *J. Clin. Microbiol.* 32:1159-1165.
8. Gall, D., and K. Nielsen. 2004. Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison. *Rev. Sci. Tech.* 23:989-1002.
9. Nielsen, K., and D. Gall. 2001. Fluorescence polarization assay for the diagnosis of brucellosis: a review. *J. Immunoassay Immunochem.* 22:183-201.
10. Nielsen, K., D. Gall, P. Smith, S. Balsevicius, F. Garrido, F. M. Duran, F. Biancifiori, A. Dajer, E. Luna, L. Samartino, R. Bermudez, F. Moreno, T. Renteria, and A. Corral. 2004. Comparison of serological tests for the detection of ovine and caprine antibody to *Brucella melitensis*. *Rev. Sci. Tech.* 23:979-987.

CARATTERIZZAZIONE DI UN SISTEMA DOSIMETRICO AD ALANINA PER APPLICAZIONI NEL CAMPO DELLA FOOD IRRADIATION.

Altieri P. R., Mangiacotti M., Marchesani G., Chiaravalle A. E.

Centro di Riferenza Nazionale per la Ricerca della Radioattività nel Settore Zootecnico-Veterinario, IZS Puglia e Basilicata, Foggia;

Key words: ESR Dosimetry, alanine, food irradiation.

ABSTRACT - Food irradiation is a technique based on the use of ionizing radiation (beams of electrons, X and γ rays) adopted to increase the microbiological safety and to extend the shelf life of a wide range of foods. Electron Spin Resonance (ESR) dosimetry with the amino acid alanine is the standard method used for both reference and transfer dosimetry. This study is aimed at characterizing a dosimetric system to control food irradiation process and to perform irradiation step required in analytical procedure such as thermoluminescence method.

INTRODUZIONE - La *food irradiation* rappresenta attualmente per l'industria alimentare un processo tecnologico in grado di soddisfare le esigenze di una adeguata conservazione degli alimenti elevando la fruibilità commerciale ed innalzando il livello della qualità igienico-sanitaria di quei prodotti trattati con radiazioni ionizzanti.

Le normative europee vigenti in materia di food irradiation prevedono che il limite massimo di dose assorbita, grandezza fisica che misura l'energia rilasciata dalla radiazione nella unità di massa, sia fissato a 10 kGy.

Attualmente sono a disposizione metodi di identificazione degli alimenti irraggiati di tipo chimico, fisico e biologico/microbiologico sia di screening che di conferma in grado di stabilire se il campione sia stato sottoposto o meno al trattamento radiante. Tuttavia un limite è rappresentato dal fatto che tali metodologie non consentono, al momento, di rivelare la dose assorbita, e quindi una valutazione della conformità alla normativa vigente. Il rispetto di tale prescrizione è demandata alle verifiche effettuate direttamente negli impianti di trattamento da parte degli organi competenti (1).

A tal fine si stanno sviluppando metodi di identificazione quantitativi per la valutazione della dose erogata alle derrate alimentari durante il processo di trattamento. Elemento essenziale per lo sviluppo di tali metodi è la disponibilità di un sistema dosimetrico idoneo per il controllo del processo sperimentale della food irradiation, oltre che per l'effettuazione di una mappatura della dose all'interno del prodotto irradiato misurandone la distribuzione. Inoltre, per l'esecuzione corretta di alcuni metodi ufficiali per l'identificazione del trattamento radiante basati su tecniche di luminescenza quali la termoluminescenza e la luminescenza fotostimolata "calibrata" (2-3), è necessario ricorrere ad irraggiamenti a livelli di dose ben determinati con l'ausilio di sorgenti di radiazioni caratterizzate dal punto di vista dosimetrico (rateo di dose, profilo di dose, etc.). Fra i sistemi dosimetrici fisici esistenti (4) quello composto dalla combinazione spettrometro ESR ed alanina rappresenta, nel campo industriale delle alte dosi, un metodo di riferimento standard applicabile nel range energetico 0.1 – 28 MeV e range di dose da 1 a 10^5 Gy, ed è attualmente impiegato sia per la dosimetria nei processi industriali che in radioterapia. Il metodo si basa sulla misura della concentrazione dei

radicali liberi stabili prodotti in seguito alla esposizione del dosimetro (alanina) alle radiazioni ionizzanti, attraverso spettroscopia ESR. I vantaggi che risiedono nell'utilizzo di un sistema di questo tipo sono molteplici:

- robustezza;
- possibilità di realizzare dosimetri di piccole dimensioni e di diverse forme;
- proprietà equivalenti a quelle dei tessuti biologici;
- lettura non distruttiva, pertanto si possono effettuare misure ripetute;
- stabilità a lungo termine dei radicali liberi radio-indotti in determinate condizioni di conservazione (temperatura e umidità);
- buona risoluzione spaziale con sufficiente sensibilità e riproducibilità delle misure anche a livello di alcuni Gy.

Va precisato che la correlazione tra la concentrazione dei radicali liberi e la dose assorbita dipende, a parità di qualità del fascio, dalla configurazione dello spettrometro, dal tipo di dosimetro e dalla funzione dose-risposta dell'alanina. Secondo la procedura standard ISO/ASTM 51607-2004 (5) i valori di dose assorbiti devono essere calcolati a partire da una curva di taratura, ossia dalla rappresentazione grafica della relazione matematica tra l'ampiezza del segnale ESR e la dose assorbita, ottenuta empiricamente per una data configurazione dello strumento, per un fissato set di parametri dell'ESR e per un dato tipo e lotto di dosimetri.

Considerata la crescente diffusione di sorgenti di irradiazione ad azionamento elettrico (acceleratori di particelle e tubi radiogeni con energie < 300 keV) in alternativa ai tradizionali sistemi con radioisotopi (Cs-137 e Co-60), e l'incremento del numero di applicazione biomediche di fasci di radiazione, fotoni ed elettroni, di bassa energia, è quanto mai necessario ed urgente implementare e caratterizzare idonei sistemi dosimetrici nei suddetti range energetici.

In tale lavoro vengono quindi presentati i dati preliminari relativi alla caratterizzazione di un sistema ESR-alanina nel campo di raggi X (d.d.p. < 150 kV) unitamente alle principali caratteristiche dosimetriche.

MATERIALI E METODI – L'apparato sperimentale utilizzato consta dei seguenti elementi: un lotto di dosimetri, un irraggiatore a raggi X ed uno spettrometro ESR.

I dosimetri utilizzati sono costituiti da pellet di alanina forniti dalla Gamma-Service Produktbestrahlung GmbH (lotto numero T020604) con le seguenti caratteristiche: diametro 4 mm; massa 65 ± 0.5 mg; altezza 3.0 mm. I pellet sono stati esposti a fasci di fotoni prodotti da un irraggiatore a raggi X della ditta RAD SOURCE Inc. Mod RS 2400.

La lettura dell'ampiezza dello spettro è stata eseguita mediante uno spettrometro ESR modello EMX 113 della ditta Bruker, dotato di cavità risonante cilindrica ed operante in banda X. Come prima operazione tre pellet di alanina sono stati estratti dal lotto ed opportunamente identificati.

Successivamente sono stati posizionati all'interno di un portacampioni in alluminio di forma geometrica rettangolare da introdurre nell'irraggiatore in posizione fissa. I dosimetri, a loro volta, sono stati alloggiati in linea orizzontale rispettando la numerazione assegnata, per poter essere irraggiati al livello di dose previsto in maniera riproducibile. Dopo il trattamento i pellet sono stati conservati al buio per preservarli dalla luce. La lettura del segnale è stata sempre eseguita 24 ore dopo l'esposizione alla radiazione per consentire la stabilizzazione del segnale stesso: i dosimetri sono stati introdotti in tubi di quarzo suprasil di diametro interno 5 mm, puliti esternamente con salviette tipo "kimwipes", per essere poi sottoposti a lettura con ESR. La fase di lettura strumentale ha previsto il posizionamento del tubo al centro della cavità e l'acquisizione dello spettro ESR adottando i parametri di registrazione riportati in tabella 1.

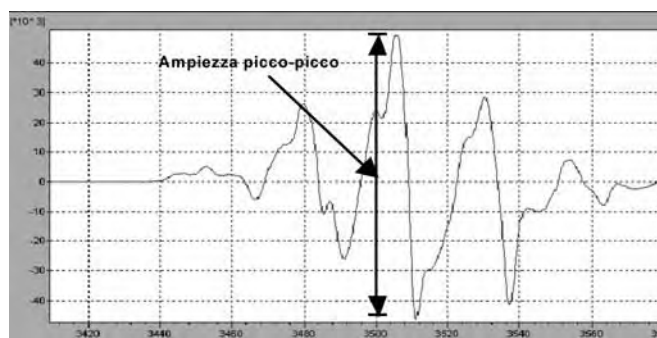
Tabella 1 - Parametri di acquisizione dello spettro ESR

Potenza a microonde	5.33 mW
Ampiezza di modulazione	1 G
Campo di scansione	200 G
Numero di scansioni	4
Costante di tempo	40.96 μ s
Risoluzione	1024

Gli stessi sono stati ottimizzati effettuando studi dell'intensità del segnale ESR variando sia la potenza a microonde che successivamente l'ampiezza di modulazione.

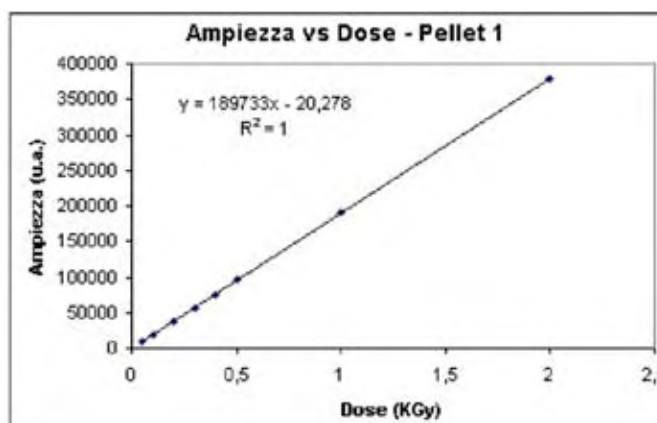
Per la misura della dose relativamente ad ogni singolo pellet, è stato scelto come parametro dosimetrico la misura dell'ampiezza picco-picco del segnale centrale (figura 1) dello spettro di alanina, essendo questa proporzionale alla concentrazione di radicali liberi presenti. Le misure sono state effettuate considerando otto valori di dose erogata (0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1, 2 kGy). Durante la procedura di irraggiamento, conservazione e lettura si è operato in condizioni di temperatura ed umidità il più possibile stabili (36,1% e 26,5 °C rispettivamente) dato che, l'ampiezza dello spettro può essere condizionata da tali fattori che costituiscono così una fonte di incertezza. Tutti i dati ottenuti sono stati registrati in un foglio di lavoro ed elaborati. In figura 2 è riportata, a titolo di esempio, la retta di taratura ottenuta per un dosimetro del set. E' opportuno sottolineare che preliminarmente alla lettura dei dosimetri irraggiati è stata effettuata la lettura di un pellet del lotto non irraggiato (anche detto "bianco"). Infatti è possibile la produzione di radicali liberi in seguito a stress fisici durante il processo di lavorazione o ad azioni meccaniche esterne. L'ampiezza del segnale è risultata compatibile con il valore nullo atteso.

Figura 1 Spettro ESR di un dosimetro irraggiato a 0.5 kGy.



RISULTATI E DISCUSSIONE – Il lavoro presenta la metodologia ed i risultati per la caratterizzazione di un sistema dosimetrico alanina-ESR. Dal fit dei dati raccolti è possibile evincere un andamento lineare della relazione dose-risposta nell'intervallo di dose preso in esame (0.05÷2 kGy) per i dosimetri del lotto (figura 2). L'analisi dei dati relativamente alla variabilità dell'ampiezza del segnale ESR fornisce un valore medio di CV% di circa l'1 %, mentre il valore della riproducibilità delle misure è risultato pari a 2,3 %. In figura 3 viene riportato il confronto tra la curva di taratura di pellet irraggiati in laboratorio e quella ottenuta a partire dal set di pellet in dotazione, muniti di certificato di taratura ed irradiati a differenti dosi con una sorgente di Co-60. Tra le due curve è evidente una differente pendenza delle rette di taratura dovuta alla dipendenza della risposta in energia del segnale ESR dell'alanina ai due differenti valori delle sorgenti di radiazioni: Co-60 (1,25 MeV) e fascio di raggi X (< 150 keV). Per questo è opportuno effettuare una correzione del dato in funzione dell'energia. La stima del "fattore di correzione" risulta essere pari a $1,41 \pm 0,04$ nel range di dose assorbita studiato.

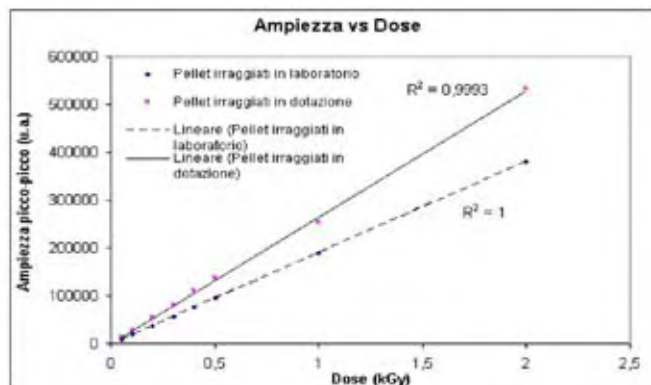
Figura 2 Retta di taratura di un pellet di alanina nel range (0.05÷2) kGy.



I risultati sperimentali confermano l'applicabilità del sistema dosimetrico ad alanina per studi nel settore della food irradiation, previa applicazione di opportuni fattori di correzione in funzione dell'energia del fascio di raggi X. Lo studio, inoltre, estende il campo di utilizzo dei dosimetri ad alanina a fasci di fotoni con energia inferiore a quelle riportate nei metodi standard (5), risultando in linea con quanto riportato in letteratura da altri autori (6-7). I risultati

preliminari sono incoraggianti e confermano l'opportunità di effettuare una caratterizzazione delle sorgenti di irradiazione al fine di assicurare la corretta esecuzione del processo di irraggiamento.

Figura 3 Curve di taratura di pellet di alanina irraggiati con sorgenti di CO-60 (linea continua) e RX (linea tratteggiata).



RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- 1) Decreto Legislativo n° 94 del 30 gennaio 2001, G.U. n° 79 del 4 aprile 2001.
- 2) UNI EN 1788, 2001 "Thermoluminescence detection of irradiated food from which silicate minerals can be isolated". European Committee of Standardization, Brussels.
- 3) Brussels. UNI EN 13751, 2009 - "Foodstuffs - Detection of irradiated food using photostimulated luminescence" European Committee of Standardization, Brussels.
- 4) Journal of the ICRU Vol 8 No 2, 2008, Report 80. Oxford University Press.
- 5) ISO/ASTM 51607-2004: Standard Practice for Use of an Alanine-ESR Dosimetry System.
- 6) A. Wieser and R. Girzikowsky, 1996. A Unique Calibration Curve for Alanine EPR Dosimetry System. Appl. Radiat. Isot. No. 11/12, pp. 1269-1275.
- 7) Robert B. Hayes, Edwin H. Haskell, Albrecht Wieser, Alexander A. Romanyukha, Byron L. Hardy, Jeffrey K. Barrus, 2000. Assessment of an alanine EPR dosimetry technique with enhanced precision and accuracy. Nuclear Instrument and methods in Physics Research A 440, pp. 453-461.

IL BOTULISMO ANIMALE: RECENTI SVILUPPI DI UNA MALATTIA ANTICA

Anniballi F.¹, Fiore A.^{1,2}, Auricchio B.^{1,2}, and Fenicia L.¹

¹Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo (CNRB), Roma; ²Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Reparto Pericoli Microbiologici Connessi agli Alimenti, Roma.

Key words: botulismo animale, diagnosi, epidemiologia

SUMMARY

Animal botulism is a worldwide underreported disease, more frequent than human botulism. Epidemiological data report outbreaks affecting mainly birds and mammals. No national and international data banks are available on confirmed cases, and a centralized collecting system should be enhanced in Italy and in Europe.

INTRODUZIONE

Il botulismo è una sindrome neuromuscolare conseguente l'azione di neurotossine, che bloccano il rilascio dell'acetilcolina a livello dei motoneuroni terminali. Le tossine (tipo A-G) sono prodotte in particolari condizioni da clostridi (*C.botulinum* o raramente *C.butyricum* e *C.baratii*) presenti nell'ambiente sottoforma di spore. Oltre l'uomo può colpire, molte specie di mammiferi, di uccelli e di pesci. La patologia umana si manifesta con paralisi flaccida, simmetrica, discendente, mentre quella animale procede in senso ascendente.

A scopi epidemiologici la malattia viene classificata in tre forme principali riscontrate sia nell'uomo che negli animali: botulismo alimentare (assunzione di alimenti contaminati con tossine preformate); botulismo da ferita (proliferazione dell'agente microbico in una ferita e produzione di tossina *in vivo*); botulismo da colonizzazione intestinale (colonizzazione temporanea del lume intestinale e produzione di tossina *in situ*).

La maggior parte dei casi di botulismo correlato agli animali da allevamento, è di tipo alimentare. Una tipica fonte di tossina è rappresentata dalle carcasse di piccoli animali morti che accidentalmente si ritrovano nei mangimi. Una fonte importante di spore è invece determinata dai rifiuti degli allevamenti di pollame che possono essere utilizzati come lettiera, come fertilizzanti, oppure come alimenti (1,2).

Negli uccelli, soprattutto quelli acquatici che non si cibano di carcasse, l'assunzione di tossina sembra essere veicolata da organismi invertebrati come le larve, o da zooplancton. Le larve non sono suscettibili alle tossine, ma nutrendosi di materiale in cui la tossina può essere presente, la concentrano. È stato dimostrato che l'ingestione anche di una sola larva può risultare fatale per molte specie aviarie, contribuendo all'auto perpetuazione della malattia (ciclo delle carcasse-larve).

La suscettibilità delle diverse specie animali alle neurotossine botuliniche varia notevolmente. Bovini, ovini, equini, uccelli acquatici e pollame sono considerati molto sensibili. Al contrario, uccelli rapaci, felini selvatici, suini e animali carnivori sono considerati resistenti. Inoltre è stata evidenziata una certa correlazione fra la specie animale e il tipo di tossina botulinica. Per esempio nei bovini la maggior parte dei casi sono correlati alle tossine tipo D e B, anche se in letteratura sono descritti casi da tossina tipo A e C. I casi di botulismo aviario in uccelli acquatici invece sono maggiormente correlati alla tossina tipo C ed E. Gli uccelli possono ospitare nel loro canale intestinale ceppi di *C. botulinum* tipo D, senza ammalarsi (1).

MATERIALI E METODI

La diagnosi di botulismo animale è spesso basata sulla combinazione dei segni clinici osservati sugli animali malati (Tabella 1) e sull'assenza di lesioni valutate durante le necropsie effettuate su animali morti o soppressi.

La diagnosi clinica necessita di conferma di laboratorio per escludere le altre patologie che rientrano in diagnosi differenziale (1).

Tabella 1. Principali segni clinici

Specie	Segni clinici
Uccelli	Incapacità al volo; paralisi membrane nittitante; collo pendulo; arresto respiratorio
Bovini	Debolezza arti posteriori, perdita tono coda e lingua, respiro affannoso, disfagia, scialorrea, coricamento sternale
Ovini-caprini	Gli stessi dei bovini
Cavalli	Disfagia, tremori muscolari, coricamento sternale
Carnivori	Paralisi arti posteriori, quadripiegia, ridotti riflessi oculari
Pesci	Incapacità di nuotare, iper-pigmentazione

La conferma di laboratorio può essere effettuata dimostrando la presenza di tossine botuliniche o spore di *C. botulinum* nei campioni biologici prelevati da animali che presentano una sintomatologia caratteristica. Supporta la diagnosi clinica il rinvenimento di tossine botuliniche o spore di *C. botulinum* negli alimenti zootecnici e negli ambienti strettamente connessi con i soggetti malati. Per la ricerca delle tossine botuliniche il metodo "gold standard" è la prova biologica su topini da laboratorio (mouse test). La ricerca del microrganismo tossigeno, viene effettuata mediante tecniche colturali associate al mouse test, o più recentemente, mediante tecniche biomolecolari di PCR. Presso il CNRB sono stati sviluppati e validati *in house* due diversi protocolli di multiplex real-time PCR che permettono un'affidabile e rapida diagnosi di laboratorio (3).

La raccolta delle informazioni relative ai casi di botulismo animale verificatisi nel territorio nazionale viene effettuata

presso il CNRB fondamentalmente in occasione della richiesta da parte dei laboratori periferici di effettuare la conferma dei casi sospetti. Vengono inoltre raccolti dati mediante:

- notifica dei focolai da parte di IIZZSS, ARPA, veterinari aziendali;
- ricerca web dei casi riportati dalla stampa locale.

Per una più sistematica raccolta delle informazioni, dal 2007 il CNRB ha elaborato, in collaborazione con alcuni IIZZSS, una scheda *ad hoc* che può essere scaricata anche dal sito web: <http://www.iss.it/spva/labo/cont.php?id=342&lang=1&tipo=18>.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Contrariamente alla patologia umana, che risulta molto rara, la patologia animale è estremamente frequente. Il botulismo aviario sembra essere la principale causa di morte della fauna avicola acquatica selvatica, con decine di migliaia di uccelli morti ogni anno. La maggior parte delle segnalazioni sono relative alle regioni dei grandi laghi tra USA e Canada. Recentemente sono inoltre stati riportati focolai in Svezia e in Corea.

Il botulismo bovino è una malattia endemica in Sudafrica, Australia e in alcune regioni del Brasile. Ulteriori episodi sono stati segnalati negli USA, in Finlandia, e nel Regno Unito, dove dal 2003 si è osservato un notevole aumento dei casi, correlato all'uso dei rifiuti degli allevamenti avicoli.

Un esteso episodio di botulismo in animali da pelliccia, in cui sono stati coinvolti circa 52000 capi è stato riportato in Finlandia nel 2002.

In Italia sono state riconosciute tutte le forme di botulismo animale. Nella Tabella 2 sono riportate alcune informazioni relative agli episodi verificatisi in Italia e le specie animali coinvolte.

Il botulismo animale rappresenta un grave problema sia dal punto di vista ambientale, (fauna selvatica), che dal punto di vista economico (animali da allevamento). Ciò nonostante non esistono misure preventive se non la pronta rimozione delle carcasse negli ambienti acquatici e la sostituzione degli alimenti in uso per quanto concerne gli allevamenti. La vaccinazione è al momento autorizzata soltanto per i bovini e nei paesi in cui il botulismo bovino è endemico. La terapia, invece è basata essenzialmente su misure di supporto. Gli antibiotici sono sconsigliati. Nei casi più gravi, l'unico trattamento per evitare condizioni di sofferenza dell'animale rimane l'eutanasia.

Per quanto concerne le implicazioni di sanità pubblica correlate ai casi di botulismo animale, gli studi riportati in letteratura presentano un rischio essenzialmente basso, specialmente se sono coinvolte le tossine tipo C e D.

Le raccomandazioni elaborate nel 2006 dall'ACMSF inglese, per bovini, ovini e caprini, riportano sostanzialmente alcune indicazioni fornite dall'AFSSA (ANSES) francese. Queste riguardano restrizioni della commercializzazione di latte e carne effettuate su base volontaria. Per i bovini la restrizione è circoscritta agli animali malati e non necessariamente estesa agli animali sani facenti parte della mandria. Tale restrizione potrebbe in futuro essere rivista se le evidenze scientifiche dimostrassero un rischio evidente, soprattutto in caso di coinvolgimento delle tossine tipo A, B, E. Per gli ovini e i caprini la restrizione è estesa anche agli animali sani facenti parte del gregge in cui sono stati diagnosticati casi di botulismo. Le restrizioni dovrebbero essere applicate per 14 giorni dalla data di inizio dell'ultimo caso, oppure per 17 giorni dall'esposizione alla tossina (2).

Studi scientifici effettuati sul latte hanno dimostrato che il trattamento termico di pastorizzazione a 72°C per 15 s è in grado di distruggere il 99.9% delle tossine tipo A e B, ed almeno il 99.5% dei loro rispettivi complessi (tossina più proteine accessorie).

Tabella 2. Casi di botulismo animale riportati in Italia

Anno	Mese	Regione	Specie coinvolte
1973	agosto	Emilia R	anatra, germano r.
1990	giugno	Emilia R	coturnice, fagiano
1994	agosto	Emilia R	anatre, airone, gabbiano
1999	luglio	Sardegna	anatra, folaga, gabbiano,
2006	agosto	Lombardia	carpa, germano r.
2007	maggio	Lazio	cavallo
	luglio	Friuli VG	fagiano
	agosto	Sardegna	anatra, folaga, gabbiano,
2008	settembre	Lazio	folaga, germano r, moretta
	agosto	Lombardia	cigno
	ottobre	Lazio	airone, germano r, oca
		Emilia R	anatra, germano r., nutria, ratto
		Friuli VG	bovini
	novembre	Lazio	germano r., moretta
2009	luglio	Umbria	cane
	agosto	Lazio	gabbiano, gallinella
		Liguria	germano r.
		Toscana	germano r.
		Trentino	bovini
		Veneto	anatra, oca
		Veneto	anatra, germano r.
2010	agosto	Piemonte	cane
	settembre	Sicilia	cane, cormorano
		Liguria	gatto, germano r.
		Puglia	gabbiano r.
		Sardegna	anatra, folaga, gabbiano,
2011	ottobre	Marche	gabbiano
	maggio	Lombardia	cigno, germano r.
	giugno	Lombardia	bovini
	luglio	Piemonte	garzetta
	agosto	Emilia R	anatra, germano, piccione

CONCLUSIONI

Nonostante il botulismo animale sia molto frequente, l'epidemiologia è fortemente sottostimata, anche perché non è prevista la notifica obbligatoria. Gli episodi riportati presso il CNRB sono essenzialmente il risultato delle segnalazioni volontarie notificate dagli IIZZSS. Sarebbe auspicabile l'organizzazione di un flusso informativo tra CNRB, Ministero della Salute e gli IIZZSS. La gestione di una banca dati sul botulismo animale richiede uno sforzo comune di raccolta delle notifiche e diffusione delle informazioni sulla malattia presso tutti gli IIZZSS e a caduta sui professionisti pubblici e privati nonché sugli allevatori. Tale banca dati sarebbe la prima anche a livello europeo e potrebbe costituire un utile strumento per uno scambio attivo di informazioni sia di carattere epidemiologico che tecnico-scientifico.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Deprez PR. Tetanus and botulism in animals. In: Clostridial in medical, veterinary and food microbiology. Diagnosis and typing. Editor in Chief J Mainil. European Concerted Action QLK2-CT2001-01267. pp 27-36.
- Hogg R, Livesey C, Payne J. Diagnosis and implications of botulism. In Practice 2008;30:392-397.
- Annibaldi F, Auricchio B, Delibato E, Antonacci M, De Medici D, and Fenicia L. Multiplex real-time PCR SYBR green for detection and typing of group III *Clostridium botulinum*. J Vet Microbiol. 2011 In press.

INDAGINE SULLA PRESENZA DI RODENTICIDI ANTICOAGULANTI NELLE ESCHIE E NEGLI ORGANI DI ANIMALI DOMESTICI AVVELENATI

Armentano A., Iammarino M., Lo Magro S., Muscarella M.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia

Key words: monitoraggio, rodenticidi anticoagulanti, HPLC/FLD

SUMMARY

A method for the simultaneous determination of eight anticoagulant rodenticides, using HPLC coupled with fluorescence detection has shown to be suitable to satisfy the demands for confirmation analyses, assuring a fast analytical response in real time, which is especially valuable in monitoring schemes and in the official check analysis. In 2010, a survey on the occurrence and incidence of these pesticides in samples of poisoned animal tissue and bait coming from two Southern Italy Regions (Puglia and Basilicata) was carried out using this analytical procedure.

INTRODUZIONE

L'entrata in vigore dell'Ordinanza Ministeriale 18/12/08 nel gennaio del 2009 contenente le norme sul divieto di utilizzo e di detenzione di esche e bocconi avvelenati ha sensibilizzato ulteriormente l'opinione pubblica sulla problematica degli avvelenamenti ed ha indotto le istituzioni scientifiche preposte a sviluppare ed impiegare metodiche di laboratorio, di screening e di conferma, per la ricerca ed il monitoraggio delle sostanze tossiche utilizzate a scopo fraudolento. L'Ordinanza, emanata al fine di preservare la vita degli animali di affezione, l'ambiente e la salute delle persone, stabilisce che la diagnosi di avvelenamento deve essere effettuata basandosi esclusivamente sulle indagini di laboratorio svolte negli Istituti Zooprofilattici Sperimentali. Dai lavori condotti risulta che i pesticidi ritrovati più frequentemente nei casi di avvelenamento sono i rodenticidi [1]. Gli anticoagulanti aventi come caratteristica strutturale comune l'anello cumarinico sono stati largamente usati nel corso degli anni come veleni per roditori. Gli anticoagulanti di seconda generazione (bromadiolone, flocoumafen, difenacoum, brodifacoum, ecc.) risultano molto più tossici rispetto a quelli di prima generazione (warfarin, coumachlor, ecc.). Il principale meccanismo d'azione di queste sostanze si basa sull'antagonismo della vitamina K, e provoca l'alterazione del meccanismo di coagulazione del sangue e conseguente emorragia fino a decesso della specie colpita [3]. Residui di queste sostanze sono quasi assenti nel contenuto gastrico, al contrario, il fegato è il principale organo di accumulo e quindi rappresenta la matrice di elezione per una diagnosi corretta di avvelenamento. In letteratura i metodi analitici maggiormente utilizzati per la determinazione dei rodenticidi anticoagulanti negli organi sono basati sulla cromatografia liquida ad elevate prestazioni (HPLC) accoppiata alla rivelazione UV o fluorimetrica (FLD) [2, 5, 6] o alla spettrometria di massa [7]. Argomento del presente lavoro è uno studio di monitoraggio su esche e organi di animali avvelenati pervenuti nel 2010 presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata. Le analisi sono state eseguite utilizzando un metodo analitico HPLC/FLD per la determinazione di otto rodenticidi anticoagulanti.

MATERIALI E METODI

Campioni analizzati: Per lo studio di monitoraggio sono stati analizzati 220 campioni sospetti di avvelenamento da pesticidi, inviati nel 2010 all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della

Puglia e Basilicata da ASL, Stazioni operative dei Carabinieri, Polizia Provinciale e Municipale, Guardia Forestale e Veterinari liberi professionisti. Le analisi chimiche che vengono solitamente effettuate su questi campioni presso la struttura complessa di chimica includono la ricerca di rodenticidi anticoagulanti, pesticidi organo fosfati e carbammati e altri pesticidi come metaldeide. Le specie animali più frequentemente coinvolte in casi di avvelenamento sono soprattutto animali da compagnia.

Preparazione del campione: Il metodo è stato precedentemente descritto in maniera dettagliata [4]. 4 g di campione omogeneizzato sono estratti con 40 ml di una miscela diclorometano/acetone (70/30 v/v). La miscela, filtrata, è purificata su cartucce STRATA SPE AI-N. Gli analiti sono eluiti con 4 ml di una miscela metanolo/ acido acetico glaciale (95/5 v/v). L'eluato è portato a secco in corrente di azoto. Il residuo, ripreso con 1 ml di metanolo e filtrato con filtri Anotop 10 LC è pronto per l'analisi HPLC.

Condizioni cromatografiche: E' stato adoperato un Cromatografo liquido Agilent Technologies SL 1200 Series (Waldbronn, Germania) corredato di rivelatore fluorimetrico (modello G1321A). La Colonna usata è stata una Phenomenex Luna C18 (250 mm x 4.6mm i.d., dimensione particelle: 5µm). Si è usata una eluizione binaria in gradiente; fase mobile: A = acido acetico 0.25% in acqua; B = acido acetico 0.25% in metanolo, un flusso di 0.5 ml/min. Temperatura colonna: 25°C. Volume di iniezione: 20 µl. λ di eccitazione: 310 nm. λ di emissione: 390 nm.

RISULTATI

Il monitoraggio è stato eseguito adoperando il metodo interno sopra descritto che è stato validato secondo quanto prescritto nel Regolamento 882/2004/CE. La valutazione del recupero e della riproducibilità intra-laboratorio del metodo sono state effettuate mediante 6 prove ripetute su un campione di fegato additivato a 2.5 mg/kg (valore medio che solitamente viene riscontrato nei campioni analizzati) per ogni analita in tre sedute differenti per un totale di diciotto prove complessive. Gli ottimi risultati della validazione, unitamente alla semplicità di esecuzione, hanno permesso l'utilizzo del metodo nello studio di monitoraggio sulla presenza di anticoagulanti su esche e organi di animali avvelenati da tali sostanze. Su 220 campioni di esche e di organi di animali, sospetti di avvelenamento per pesticidi, provenienti dalle regioni di Puglia e Basilicata nel 2010, 27 campioni sono risultati positivi (12%) per rodenticidi anticoagulanti. In Figura 1 è riportato un grafico con la distribuzione degli anticoagulanti individuati nei campioni analizzati. Come riportato nella Figura 1 il rodenticida anticoagulante più frequentemente riscontrato nei campioni positivi è il Coumachlor (38%). In Figura 2, sono riportati i cromatogrammi di alcuni campioni di esche e di fegato risultati positivi per bromadiolone, brodifacoum e coumachlor. Al fine di avere un quadro generale sulle concentrazioni riscontrate, in Figura 3 è riportata la percentuale del numero dei campioni positivi per rodenticidi anticoagulanti in funzione di tre diversi range di concentrazioni (< 10 mg/kg, 10-20 mg/kg, >20 mg/kg).

DISCUSSIONE

Come si può osservare dal grafico statistico riportato in Figura 3, più del 60% dei campioni positivi per rodenticidi anticoagulanti hanno una concentrazione inferiore a 10 mg/kg. Il metodo proposto, applicato a campioni reali, ha mostrato un'ottima selettività, nonostante la notevole complessità delle matrici e le basse concentrazioni di rodenticidi riscontrate nella maggior parte dei campioni analizzati e quindi può essere considerato un metodo di conferma alternativo alla spettrometria di massa. I cromatogrammi riportati in Figura 2, riferiti a campioni di fegato e di esche, mostrano, infatti, picchi cromatografici ben risolti e privi d'interferenti. Da un'analisi dei dati ottenuti dall'indagine dei campioni sospetti di avvelenamento analizzati si evince che la percentuale di positività per la presenza di rodenticidi anticoagulanti riscontrata in campioni pervenuti presso il nostro Istituto è simile a quella nazionale [1]. Dallo studio condotto sui campioni analizzati, tuttavia, è emerso come i casi di avvelenamento siano associati più frequentemente alla presenza di rodenticidi anticoagulanti di prima generazione come il Coumachlor e il Warfarin, a differenza di quanto riportato in letteratura [1] per casi di avvelenamento nel Nord Italia, ad opera prevalentemente di rodenticidi di seconda generazione.

Figura 1: Distribuzione dei vari anticoagulanti in campioni positivi analizzati presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata nel 2010

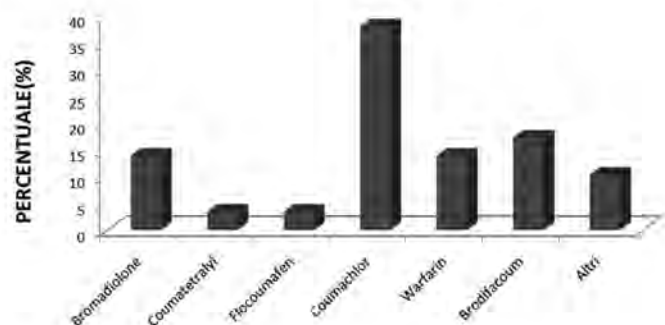


Figura 2: Cromatogrammi di campioni di fegato e di esche positivi per anticoagulanti: a) fegato di gatto positivo per Coumachlor (14.8 mg/kg), b) campione di esca positivo per Coumachlor (2.8 mg/kg), c) fegato di cane positivo per Brodifacoum (14.5 mg/kg), d) campione di esca positivo per Bromadiolone (14.2 mg/kg)

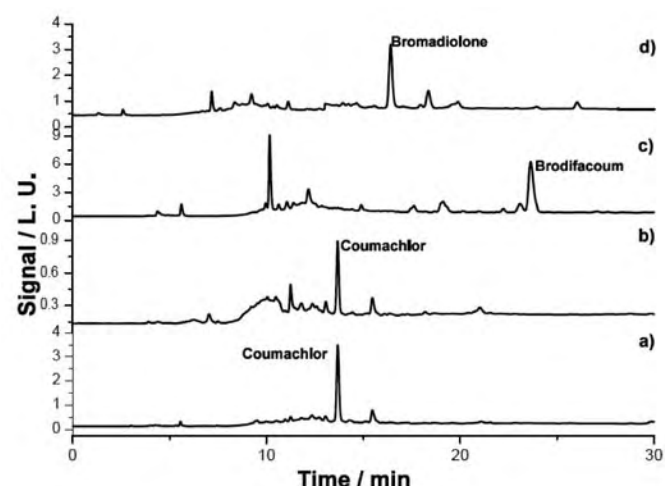
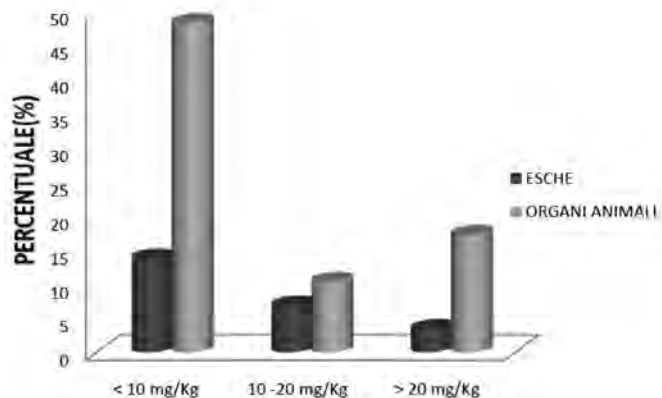


Figura 3: Distribuzione delle concentrazioni dei rodenticidi nei campioni positivi analizzati presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata nel 2010. Le percentuali riportate sono sul totale dei campioni positivi per rodenticidi



CONCLUSIONI

Un'indagine per individuare la presenza di rodenticidi anticoagulanti è stata condotta su 220 campioni sospetti di avvelenamento mediante un metodo analitico HPLC/FLD validato per le molecole di bromadiolone, brodifacoum, coumachlor, coumatetralyl, difenacoum, flocoumafen e warfarin. Dai dati del nostro studio è emerso che i rodenticidi anticoagulanti sono presenti nel 47% dei campioni positivi per pesticidi, e che il Coumachlor è l'anticoagulante più comunemente usato. Ulteriori indagini e studi collaborativi nell'ambito dell'intera rete degli Istituti Zooprofilattici presenti sul territorio nazionale, riguardo la ricerca di tali sostanze nei casi di avvelenamento, potrebbero essere un valido supporto ai veterinari nella loro attività diagnostica.

BIBLIOGRAFIA

- Berny P., Caloni F., Croubels S., Sachana M., Vandenbroucke V., Davanzo F., Guitart R., (2010), Animal poisoning in Europe. Part 2: Companion animals, Vet. J., 183, 255-259.
- Guan F., Ishii A., Seno H., Watanabe K., Kumazawa T., Suzuki O. (1999), A method for simultaneous determination of five anticoagulant rodenticides in whole blood by high performance liquid chromatography, J. Pharm and Biomed Analysis, 21, 179-185.
- Hirsh M. D. J. (1993), Oral anticoagulant drugs, N. Engl. J. Med, 324, 1865-1875.
- Iammarino M., Haouet N., Lo Magro S., Nardiello D., Muscarella M. (2010), Analisi multiresiduale di rodenticidi anticoagulanti nelle esche e nel fegato mediante cromatografia liquida e rivelazione fluorimetrica, poster presentato, Congresso Nazionale XII S.I.Di.L.V.
- Jin M., Chen X. H., Zhu Y. (2007), Determination of five 4-hydroxycoumarin rodenticides in animal liver tissues by ion chromatography with fluorescence detection, J. Chromatogr A, 1155, 57-61.
- Ring P. R., Bostick J. M. (2000), Validation of a method for the determination of (R)-Warfarin and (S)-Warfarin in human plasma using LC with UV detection, J. of Pharm. and Biomed. Analysis, 22, 573-581.
- Vandenbroucke V., Desmet N., De Baccker P., Croubels S. (2008), Multi-residue analysis of eight anticoagulant rodenticides in animal plasma and liver using liquid chromatography combined with heated electrospray ionization tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. B, 869, 101-110.

E.COLI/VEROCITOTOSSICI NELLA FILIERA LATTIERO CASEARIA OVICAPRINA DEL GARGANO (PUGLIA-ITALY): PRIMI DATI DI PREVALENZA

Azzarito L.¹, Crisetti E.¹, D'Alessandro M.¹, Di Stefano A.², Nardella M.C.¹, Chiocco D.¹, La Salandra G.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e Basilicata, Foggia; ²ASL FG, Servizio Veterinario Area "A"- Area Sud

Key words: *E. coli*, VTEC, Real-time PCR

ABSTRACT

The presence of verocytotoxin-producing of *Escherichia coli* (VTEC) in foods of animal origin is a public health problem. *E. coli* VTEC are bacteria responsible for serious human illnesses, such as hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. The aim of this work is to provide preliminary data on *E. coli* VTEC strains isolated from raw milk of ovine and goat, collected from local farms (Apulia region).

INTRODUZIONE

Escherichia coli è un microrganismo saprofita dell'intestino dell'uomo e degli animali, da sempre considerato indice di contaminazione fecale. Nell'ambito di questa specie sono presenti cloni patogeni verocitotossici (VTEC) capaci di produrre 2 tossine (VT1 e VT2) codificate dai geni batteriofagi *stx1* e *stx2*. La patogenicità dei ceppi VTEC è legata anche ad una proteina di membrana detta intimina, codificata dal gene cromosomiale *eae* responsabile dell'adesione alle cellule dell'epitelio intestinale e considerato un carattere comune dei ceppi VTEC altamente patogeni (2). I microrganismi sono divisi in linee evolutive diverse, a seconda del loro potere patogeno per l'uomo. La linea EHEC-1 comprende *E.coli* O157 e stipiti correlati (quali O145) che sono altamente patogeni per l'uomo, potendo indurre sintomi che variano da semplici forme gastroenteriche a colite emorragica, sindrome emolitica-uremica (SEU) e porpora trombotica trombocitopenica (PTT). La linea EHEC-2 raggruppa, invece, tutti gli stipiti che appartengono a sierogruppi diversi (ad esempio O26, O103 ed O111) e che sono in grado di provocare quadri diarroici, colite emorragica e SEU (7).

L'incidenza più alta delle infezioni con conseguente SEU, si è registrata nelle categorie a rischio, quali bambini, anziani e soggetti immunodepressi. I piccoli ruminanti sono tra i principali "reservoir" di tali microrganismi. Le infezioni da VTEC sono trasmesse all'uomo attraverso il consumo di alimenti contaminati (4).

Negli ultimi anni sono stati riportati numerosi casi di infezione umana da VTEC non-O157 (1, 3). Tra i sierogruppi non-O157 quelli maggiormente isolati sono gli stipiti VTEC O26, O103, O111 ed O145, tutti patogeni capaci di provocare severi quadri clinici (9,10). I recenti casi di focolai epidemici verificatisi in Germania e Francia evidenziano la presenza di sierotipi patogeni non compresi tra quelli di solito associati ad infezioni, come il sierogruppo *E. coli* O104:H4, responsabile dell'epidemia, che produce la tossina VT2 ma è privo del gene cromosomiale *eae* codificante per la proteina di membrana intimina, considerato quest'ultimo un segno distintivo dei VTEC patogeni (2).

Questo studio preliminare ha l'obiettivo di fornire un contributo sulla diffusione di *E. coli* VTEC in latte ovicaprino utilizzato per la caseificazione sul promontorio del Gargano (Puglia-Italy) in relazione al sistema di allevamento, prevalentemente estensivo, al metodo di mungitura che è sempre manuale, ed alle razze autoctone (Gentile di Puglia merinizzata, Comisana, Altamura e Garganica).

MATERIALI E METODI

Nel periodo gennaio-giugno 2011 sono stati prelevati ed analizzati 60 campioni di latte crudo di massa ovino e caprino provenienti da aziende del promontorio del Gargano. L'analisi dei campioni è stata condotta seguendo la metodica in Real-time PCR per la ricerca di *E. coli* produttori di tossine Shiga-like (STEC) ISO-TS 13136:2011 (6). I 60 campioni di latte crudo sono stati analizzati per la ricerca dei geni di virulenza che codificano le verocitotossine (*stx1* ed *stx2*) e per l'intimina (*eae*). Per quel che riguarda il sierogruppo O104 si è utilizzato il metodo proposto dal UE RL per *E. coli* in Real-Time PCR qualitativa, basato sulla ricerca del gene *wzx* O104 che codifica per l'antigene somatico O e *fliC* H4 che codifica per l'antigene flagellare H4(5). I campioni risultati positivi sono stati confermati con metodo microbiologico, come prevede la norma di riferimento (6). Come controlli positivi sono stati utilizzati i ceppi forniti dall'EU RL VTEC, mentre come controllo negativo è stato utilizzato il ceppo *E. coli* ATCC 25922.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati di questo lavoro riportati nella figura 1 e tabella 1 evidenziano che, su 60 campioni di latte di massa di origine ovina (29), caprina (22) ed ovicaprina (9), 5 sono risultati positivi per la ricerca di stipiti di *E. coli* produttori di verocitotossine (VTEC) (8,3%), di cui 3 di origine ovina (sierogruppi O157, O145 ed O26) (5%), e 2 di origine ovicaprina (sierogruppo O157) (3,3%), nessun campione di origine caprina è risultato positivo ai geni *stx*. I risultati confermano, come riportato in letteratura, che anche gli ovini e caprini possano fungere da "reservoir" per tali microrganismi (8). I due campioni di origine ovina che hanno evidenziato la presenza dei geni *stx2* ed *eae* sono risultati associati al sierogruppo O157 e O145 rispettivamente, mentre i due campioni di latte di massa ovicaprino che possiedono uno i geni *stx2* ed *eae* ed uno i geni *stx1* ed *eae* sono associati entrambi al sierogruppo O157. L'unico campione che ha evidenziato la presenza dei geni *stx1*, *stx2* ed *eae*, di origine ovina, è risultato associato al sierogruppo O26. Nessun campione positivo ai geni *stx* è risultato positivo al gene *wzx* O104. Gli allevamenti presi in esame sono situati sul promontorio del Gargano e costituiti da razze autoctone ovine (Gentile di Puglia merinizzata, Comisana ed Altamura) e caprine (Garganiche). Tutti i campioni risultati positivi sono stati prelevati da allevamenti di tipo semiestensivo con più di 300 capi, dove la mungitura viene effettuata manualmente.

Le "foodborne diseases" causate da ceppi VTEC rappresentano un importante problema di sanità pubblica. I piccoli ruminanti sono uno dei più importanti "reservoir" di VTEC patogeni per l'uomo ed è stato descritto un aumento della prevalenza di un'ampia varietà di sierotipi nel tratto intestinale di ovini clinicamente sani, che possono determinare condizioni di rischio per i consumatori (8).

Oggi gli alimenti maggiormente incriminati sono rappresentati da carni crude o poco cotte, latte non pastorizzato e suoi derivati e vegetali non lavati correttamente (4,8). La contaminazione

avviene durante la mungitura o nelle fasi di macellazione e lavorazione della carcassa. Alimenti come latte di capra e formaggi ovicaprini a latte crudo seppure in misura minore, sono stati coinvolti in episodi tossinfettivi (7).

La presenza di ceppi *E. coli* VTEC in alimenti rappresenta un serio rischio per la salute del consumatore in particolare quando non si adoperano le necessarie misure atte ad evitare la replicazione del microrganismo, così come potrebbe accadere sul promontorio del Gargano dove esiste una notevole tradizione di produzioni lattierocasearie ovicaprine a base di latte crudo o pastorizzato, con meno di 60 giorni di stagionatura. I dati preliminari di questo lavoro, possono essere utilizzati per valutare la diffusione di VTEC nella filiera lattiero casearia pugliese. Ulteriori studi si rendono necessari sul latte crudo e sui formaggi per meglio definire la prevalenza di ceppi VTEC ed il loro potenziale impatto sulla salute pubblica.

BIBLIOGRAFIA

- Brooks JT, Sowers EG, Wells JG, Greene KD, Griffin PM, Hoekstra RM, Strockbine NA. 2005. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. *J Infect Dis.*192(8):1422-9.
- Caprioli A, Morabito S, Brugère H, Oswald E. 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res.* 36(3):289-311.
- Caprioli A, Tozzi AE, Rizzoni G, Karch H. 1997. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Europe. *Emerg Infect Dis.*;3(4):578-9.
- Dambrosio A, Lorusso V, Quaglia NC, Parisi A, La Salandra G, Virgilio S, Mula G, Lucifora G, Celano GV, Normanno G. 2007. *Escherichia coli* O26 in minced beef: prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern. *Int J Food Microbiol.* 118(2):218-22.
- EU RL per *E. Coli* "Detection and identification of verocytotoxin producing *Escherichia coli* VTEC O104:H4 inn food by Real time PCR" method food 2 rev 1 02/06/2011.
- ISO-CEN Technical Specification "Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) belonging to O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups- Qualitative Method" (ISO-TS13136).
- Mainil J.C., Daube G. (2005). Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, human and foods: who's who? *J Appl Microbiol.*98(6):1332-1344.
- Normanno G, Parisi A, Dambrosio A, Quaglia NC, Montagna D, Chiocco D, Celano GV. 2004. Typing of *Escherichia coli* O157 strains isolated from fresh sausage. *Food Microbiology.* 21(1) :79-82.
- Scheutz F., Olsen B., Engberg J.(2001).Clinical features and epidemiology of infections by Verocytotoxigenic *E.coli* (VTEC) from Danish patients 1997-2000, and characterisation of VTEC isolates by serotypes and virulence factors. *Epidemiology of Verocytotoxigenic E. coli* pp.58-66. Verocytotoxigenic *E.coli* in Europe, Concerted Action Group CT98-3935.
- Tozzi A.E., Rizzoni G., Procaccino M.A., Minelli F., Marziano M.L., Scavia G., Bigotti M. (2004). Sorveglianza della Sindrome Emolitico-Uremica in Italia. In: *Procedings IV Workshop nazionale Enter-net Italia- Sistema di sorveglianza delle infezioni enteriche*, p.7, Roma, 25-26 novembre.

Lavoro svolto con i fondi RC del Ministero della Salute, IZSPB 09/10

Figura 1. Campioni di latte analizzati per la presenza di ceppi *E. coli* VTEC

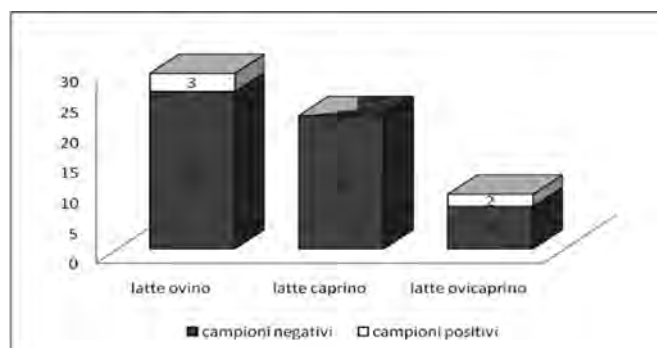


Tabella1. Caratterizzazione degli isolati *E. coli* VTEC

Campioni	Origine	Sierogruppo	Geni di virulenza
Latte	ovino	O157	<i>eae+</i> , <i>stx1-</i> , <i>stx2+</i>
Latte	ovino	O145	<i>eae+</i> , <i>stx1-</i> , <i>stx2+</i>
Latte	ovino	O26	<i>eae+</i> , <i>stx1+</i> , <i>stx2+</i>
Latte	ovicaprino	O157	<i>eae+</i> , <i>stx1-</i> , <i>stx2+</i>
Latte	ovicaprino	O157	<i>eae+</i> , <i>stx1+</i> , <i>stx2-</i>

PRESENZA DI NOROVIRUS IN MOLLUSCHI EDULI LAMELLIBRANCHI IN UN IMPIANTO DI DEPURAZIONE DEL GOLFO DI LA SPEZIA (2008-2010)

Barbaro A. ¹, Battistini R. ², Vitale N. ¹, Chiavacci L. ¹, Rossini I. ², Gorla M. ³, Sant S. ³, Ercolini C. ², Serracca L. ²

¹ S.S. Osservatorio Epidemiologico, Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino;

² S.S. Microbiologia Marina, Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, sezione La Spezia;

³ S.C. Biotecnologie, Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino.

Key words: Norovirus, shellfish, PCR, depuration

Parole chiave: Norovirus, molluschi bivalvi, PCR, depurazione

SUMMARY

Shellfish consumption has always been one of the major risk factors for Norovirus infection, especially when these products are eaten raw or slightly cooked, because depuration and relaying would occasionally be inadequate to remove viruses from live bivalve shellfish. The aim of this work was to assess the effectiveness of depuration treatments currently in use for purification of bivalve molluscs against Norovirus during the period November 2008 March 2010 in a purification plant in the gulf of La Spezia. A total of 144 samples of purified bivalve molluscs (*Mytilus galloprovincialis*) were examined by RT-PCR. The results showed the presence of viral RNA in 11 of 144 samples. These results demonstrated that shellfish depuration treatments currently used are insufficient for the complete removal of noroviruses, therefore becomes essential the improvement of these systems and the preventive measures.

INTRODUZIONE

I molluschi eduli lamellibranchi bivalvi sono implicati da sempre nella trasmissione di malattie gastroenteriche di origine virale soprattutto per la loro capacità di accumulare e concentrare patogeni nella ghiandola digestiva, e per il modo in cui vengono abitualmente consumati. Essi infatti non vengono eviscerati, e spesso vengono mangiati crudi o cotti solo all'apertura delle valve, il che accade dopo appena un minuto di cottura a vapore. Occorrono invece almeno 3 minuti di bollitura per raggiungere una temperatura interna adatta all'inattivazione dei virus (1). La cottura di per se quindi non rappresenta sempre un fattore di protezione assoluto (2).

La contaminazione virale dei mitili rappresenta un rischio elevato per la salute dell'uomo, in quanto le patologie gastroenteriche virali possono essere causate anche da una bassa carica virale che potrebbe residuare dopo trattamento termico non adeguato. Inoltre spesso, essendo i sintomi gastrointestinali di lieve entità, i casi presenti nella popolazione sono sottostimati. Prima degli anni '90 non era possibile assegnare una eziologia certa a molte epidemie legate al consumo di mitili; successivamente, grazie allo sviluppo delle tecniche di biologia molecolare, è stato possibile riconoscere i Norovirus come responsabili di infezioni gastrointestinali di origine alimentare (6-7). I *Norovirus* possono infatti resistere a temperature superiori a 60° C ed inferiori a 0° C, a concentrazioni di cloro fino a 100 ppm ed ad altri disinfettanti ambientali, per cui è molto difficile la loro eliminazione dall'acqua potabile e dall'ambiente. Studi condotti allo scopo di testare l'efficacia di diversi processi di depurazione a cui sono normalmente sottoposti i molluschi hanno dimostrato che tali trattamenti non sempre assicurano la bonifica del prodotto da contaminazioni

virali in quanto il corpo del mollusco esercita un effetto protettivo sui virus presenti (8-9). Il presente lavoro ha avuto l'obiettivo principale di dimostrare, attraverso la rilevazione di campioni positivi, la scarsa efficacia dei trattamenti subiti dai molluschi bivalvi depurati e destinati al consumo umano: secondariamente è stato valutato l'effetto stagionalità.

MATERIALI E METODI

Nel periodo Novembre 2008 - Marzo 2010 sono stati esaminati 144 campioni di molluschi bivalvi (*Mytilus galloprovincialis*) provenienti da un impianto di depurazione di La Spezia a cui affluiscono molluschi da 6 siti di allevamento della zona. L'impianto prevede la depurazione dei mitili attraverso lo stazionamento per 24 ore in vasche con acqua di mare filtrata ed ozonizzata.

Figura 1 - La mappa rappresenta il golfo di La Spezia. In piccolo la mappa della Liguria con evidenziata la provincia di La Spezia. I pallini neri rappresentano i 6 siti di prelievo campioni.



Da ogni campione, costituito da sacchetti contenenti 1-2 kg di mitili, sono stati prelevati epatopancreas fino a raggiungere il peso complessivo di 25 g. Il materiale ottenuto, dopo omogeneizzazione, è stato sottoposto a trattamento con tampone glicina 0.05 M pH 9.2, e a concentrazione delle particelle virali eventualmente presenti mediante doppia precipitazione in PEG8000 e successive centrifugazioni ad alta velocità (10000 x g). Il pellet finale è stato risospeso in acqua ultrapura e sottoposto ad estrazione dell'RNA genomico mediante kit commerciali basati sul legame di affinità dell'RNA a membrane di silice. Il campione così ottenuto è stato infine analizzato per la ricerca di RNA genomico di Norovirus mediante una booster RT-PCR descritta da Vinjé e Koopmans (10). I campioni risultati positivi sono stati sottoposti a sequenziamento genico e le sequenze ottenute sono state comparate a quelle depositate con l'European Foodborne Viruses Database (<https://hypocrates.rivm.nl/bnwww>) per l'identificazione del genotipo.

E' stata condotta un'analisi statistica bivariata con il test statistico chi quadrato tra presenza di norovirus e i fattori di stagionalità (mese e anno dei prelievi) per valutare se la presenza di norovirus fosse influenzata dal periodo dei prelievi dei campioni di mitili. In particolare si voleva valutare se durante i mesi estivi fosse più frequente la presenza di norovirus nei mitili.

Grafico 1 - Distribuzione dei mitili esaminati per la ricerca di norovirus. Sull'asse delle X è rappresentato l'arco temporale, sull'asse delle Y il numero di campioni esaminati.

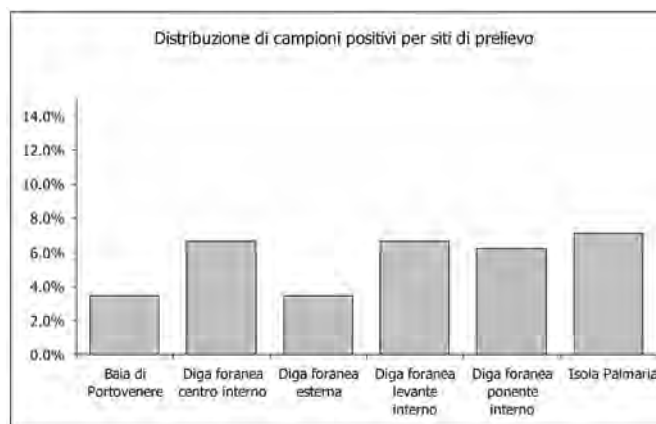


RISULTATI E DISCUSSIONE

Le indagini condotte hanno consentito di individuare la presenza di RNA Norovirus in 11 dei 144 campioni di mitili analizzati (7,6%). Le positività si sono riscontrate nei mesi di marzo, aprile, maggio, settembre e novembre (Grafico 1) e tutti i campioni sono risultati appartenenti al genogruppo II. L'analisi statistica bivariata tra presenza di norovirus e periodo temporale (mese ed anno di prelievo campioni) non ha evidenziato associazione statistica tra presenza del virus e stagionalità (χ^2 9,03 pvalue=0.38 per il fattore mese e χ^2 0,44 pvalue=0,8 per il fattore anno).

Campioni positivi sono stati trovati in tutti i siti di allevamento (Grafico 2).

Grafico 2 - Il grafico a barre mostra sull'asse delle X i siti di prelievo e sull'asse delle Y la percentuale di campioni di mitili trovati positivi per Norovirus alla PCR sul totale dei campioni di mitili esaminati sullo stesso sito di prelievo.



L'identificazione di RNA virale nei mitili depurati indica un potenziale pericolo per i consumatori e mette in evidenza il fatto che i molluschi crescono in acque contaminate e che, in linea con quanto osservato in altri lavori (11), i trattamenti di depurazione attualmente in uso nell'impianto non sono sufficienti a garantire l'eliminazione dei virus presenti. Studi sull'efficacia della depurazione con ozono di *Mytilus galloprovincialis* contaminati con Poliovirus 1 e HAV hanno dimostrato come, anche se durante la prime 24 ore di depurazione si assisteva ad una rapida diminuzione del titolo, gli enterovirus erano ancora rilevabili dopo 72 ore (12). Visto che la rimozione di Norovirus non sembra possibile con gli attuali trattamenti di depurazione, diventa fondamentale l'applicazione di metodi di depurazione più efficaci compatibilmente con i parametri sanitari ed organolettici da una parte ed i tempi tecnici richiesti dal mercato dall'altra. Altrettanto importante risulta l'adozione di ulteriori misure preventive quali il monitoraggio delle aree di produzione al fine di valutare l'effettiva presenza del virus, l'individuazione di aree a rischio ed una maggiore attenzione al trattamento dei liquami grezzi.

BIBLIOGRAFIA

- Hewitt J, Greening GE (2006) J Food Prot. 69(9), 2217-23.
- Baert L, Debevere J, Uyttendaele M (2009) Int J Food Microbiol, 131(2-3), 83-94.
- Ando T, et al (1995) J Med Virol, 47(2), 145-52.
- Kingsley DH, Meade GK, Richards GP (2002) Appl Environ Microbiol, 68(8), 3914-8.
- Green J, et al (1998) Appl Environ Microbiol, 64(3), 858-63.
- Koopmans M, Duizer E, (2004) Int J Food Microbiol, 90(1), 23-41.
- Parashar UD, Monroe SS, (2001) Rev Med Virol, 11(4), 243-52.
- Richards, G.P. (1988) J Food Protect, 51, 218-251.
- Le Guyader FS, et al (2006) Emerg. Infect Dis, 12, 931-936.
- Vinijé J, Koopmans M (1996) J Infect Dis, 174(3), 610-5.
- Croci L, et al (2007) Int J Food Microbiol, 114, 252-257.
- Croci L, et al (1992) Actes de Conf Intern sur la Purification des Coquillages, France 6-8 Apr.

Ricerca condotta nell'ambito del Progetto di Ricerca Corrente 2007 "Valutazione della presenza di norovirus nell'allevamento e produzione di molluschi eduli lamellibranchi prodotti nel golfo di La Spezia, strategie di controllo e comunicazione del rischio."

PRESENZA DI *Paenibacillus larvae* GENOTIPO ERIC II IN ITALIA. DIFFERENZE FENOTIPICHE TRA IL GENOTIPO ERIC I E IL GENOTIPO ERIC II

Bassi S.¹, Paganelli G. L.¹, Carpana E.², Gelmini L.¹, Salogni C.³, Carra E.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna – Via Diena 16, Sezione di Modena

² Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura – Unità di Ricerca di Apicoltura e Bachicoltura – Via di Saliceto 80, Bologna

³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna – Via A. Bianchi 7/9, Brescia

Key words: American foulbrood, Genotypes ERIC I and ERIC II, *Paenibacillus larvae*

SUMMARY

Recently it has been demonstrated the existence of genotypes of *Paenibacillus larvae* with different virulence and phenotype. The recognition of the phenotypic characteristics of these genotypes is crucial for a correct laboratory diagnosis. Also the knowledge of the strains circulating in a given area is important because the different pathogenicity can affect the expression of some aspects of the disease. Here we show the results of the characterization of some strains of *P. larvae* isolated in our Institute in 2010.

INTRODUZIONE

Paenibacillus larvae (*P. larvae*), batterio sporigeno Gram +, è l'agente causale della Peste Americana (PA) delle api (3).

Gli studi di caratterizzazione genetica con applicazione di diverse tecniche biomolecolari hanno messo in evidenza la presenza di diversi genotipi di *P. larvae* (4, 6, 7).

La PCR con impiego di Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) primers consente di identificare quattro differenti patterns denominati ERIC I - II - III - IV (3).

Questi genotipi oltre ad avere diverse caratteristiche fenotipiche differiscono anche per la loro virulenza (5).

La diversa virulenza sembra condizionare la progressione della malattia e, per certi aspetti, anche il quadro clinico (9) quindi l'identificazione dei genotipi presenti in un apiario o in un territorio assume un'importanza pratica non secondaria.

Le differenze fenotipiche più significative riguardano la morfologia delle colonie (3, 7).

In Germania, Svezia, Finlandia e Austria è stata dimostrata la presenza dei genotipi ERIC I e ERIC II (3, 6, 8) negli altri Paesi europei non esistono dati relativi ai genotipi circolanti.

Scopo del nostro lavoro è stato quello di sottoporre a genotipizzazione e a caratterizzazione biochimica ceppi di *P. larvae* isolati nel corso del 2010 al fine di acquisire informazioni sui genotipi ERIC presenti nel nostro territorio.

MATERIALI E METODI

Sono stati esaminati 20 ceppi di *P. larvae* isolati da detriti invernali (11 ceppi), da miele (1 ceppo) e da larve (8 ceppi) provenienti da singoli alveari di 18 apiari delle province di Modena, Bologna, Ravenna, Reggio Emilia e Brescia.

L'identificazione di conferma è stata eseguita in PCR (2).

I ceppi sono stati selezionati sulla base della diversa morfologia delle colonie nelle piastre di primo isolamento.

Esami biochimici

Per lo studio del profilo biochimico è stato impiegato il sistema API® 50 CH (BioMérieux) seguendo le indicazioni fornite dal produttore. Abbiamo esaminato colture di 24 ore. Per la semina delle gallerie è stata utilizzata una sospensione batterica in API® 50 CHB medium con densità pari al tubo 2 della scala Mc Farland. Le letture sono state fatte dopo 48 ore di incubazione in atmosfera arricchita con il 10% di CO₂.

P. larvae mostra una scarsa attività fermentante. La lettura visiva delle prove in questi casi si presta a interpretazioni soggettive. Sono state considerate positive solo le prove in cui la reazione era nettamente positiva. Le fermentazioni deboli e parziali, che potevano portare a differenti interpretazioni del risultato, sono state considerate negative.

Esami biomolecolari

Da colture batteriche di 24 ore il DNA è stato estratto secondo il protocollo descritto da Genersh et al. (3, 4). Per ciascun campione è stata condotta la PCR utilizzando la coppia di primers ERIC1R /ERIC2 in un volume finale di 25µl impiegando i reagenti e le condizioni di amplificazione descritte in bibliografia (3, 4). Cinque µl del prodotto di amplificazione sono stati analizzati in gel di agarosio al 0,8%. Le bande di DNA sono state colorate con Bromuro di Etidio e visualizzate mediante UV.

RISULTATI

In primo isolamento le colonie dei ceppi esaminati presentavano due diversi morfotipi. Al primo appartenevano colonie riferibili a tipiche colonie di *P. larvae*: colore bianco-grigiastro, a volte diafane e quasi trasparenti, superficie piatta, granulosa, asciutta o leggermente lucente, margine irregolare. Al secondo appartenevano colonie di aspetto ceroso, con superficie liscia, leggermente ombelicate, mai trasparenti, a margine, in genere, netto. Queste colonie presentavano spesso una pigmentazione arancione che poteva avere intensità variabile e diversa localizzazione.

In alcuni casi la pigmentazione era più intensa nella zona circolare esterna della colonia dove formava un anello ben evidente (pigmentazione "anulare"), in altri casi era presente solo in uno o più settori della colonia dove assumeva l'aspetto di un cuneo arancione con il vertice verso il centro della colonia e la base verso il margine esterno (pigmentazione "settoriale"). A volte le colonie, pur avendo la morfologia descritta, mostravano in primo isolamento un colore bianco cera ma nelle subcolture davano luogo a colonie pigmentate. La genotipizzazione mediante ERIC-PCR ha permesso di distinguere tutti i ceppi in esame come ERIC I o ERIC II secondo le specifiche riportate da Genersh et al. (3). In particolare erano visibili la banda di 970bp comune ai genotipi ERIC I e ERIC II ma mancante nei genotipi ERIC III e ERIC IV e la banda a 2800bp presente solo nel genotipo ERIC II (Figura 1).

I risultati degli esami eseguiti sono riassunti nelle tabelle 1 e 2. Sono stati riportati solo i risultati delle prove biochimiche che hanno mostrato un potere discriminante, escludendo quelle i cui risultati erano variabili all'interno dei due gruppi o che davano gli stessi risultati per i ceppi di entrambi i gruppi.

La fermentazione del fruttosio, del mannosio e del mannitolo è risultata sempre positiva nei ceppi atipici pigmentati e negativa in quelli classici.

DISCUSSIONE

Viene dimostrata per la prima volta la presenza di *P. larvae* genotipo ERIC II nel nostro Paese.

La conoscenza delle caratteristiche morfologiche delle colonie di questo genotipo è di importanza fondamentale e la mancata conoscenza delle possibili varianti può portare ad errori diagnostici.

Esiste una correlazione tra la morfologia delle colonie e i risultati della tipizzazione genetica con ERIC primers; le colonie tipiche sono sempre risultate appartenere al genotipo ERIC I, quelle atipiche e pigmentate al genotipo ERIC II.

Si osserva inoltre la presenza di due distinti patterns metabolici. La fermentazione del fruttosio, del mannosio e del mannitolo sembra essere genotipo-specifica. A conclusioni analoghe erano giunti Neuendorf et al. (7) e Genersch et al. (3)

Ai due genotipi corrisponderebbero quindi due diversi biotipi.

La fermentazione della salicina che in altri lavori risulta sempre positiva per il genotipo ERIC I e negativa per ERIC II (3) nel nostro caso ha dato esito negativo per tutti i ceppi in esame. Probabilmente ciò è imputabile al fatto che la fermentazione della salicina è spesso parziale e produce un debole viraggio cromatico dell'indicatore (3, 1) quindi un criterio di lettura severo come quello da noi applicato può portare a discordanze nella lettura del test.

BIBLIOGRAFIA

1. Carpana E., Marocchi L., Gelmini L. (1995). Evaluation of the API 50CHB system for the identification and biochemical characterization of *Bacillus larvae*. *Apidologie* **26**, 11-16.
2. Bassi S., Carra E., Carpana E., Paganelli G.L., Pongolini S. (2010). A scientific note on the detection of spores of *Paenibacillus larvae* in naturally and artificially contaminated honey: comparison of cultural and molecular methods. *Apidologie* **41**, 425-427.
3. Genersch E., Forsgren E., Pentikäinen J., Ashiralieva A., Rauch S., S., Kilwinski J., Fries I. (2006). Reclassification of *Paenibacillus arvae* subsp. *pulvificiens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies classification. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 501-511.
4. Genersch E., Otten C. (2003). The use of repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) for genetic subtyping of German field isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. *Apidologie* **34**, 195-206.
5. Genersch E., Ashiralieva A., Fries I. (2005). Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honeybees. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 7551-7555.
6. Loncaric I., I. Derakhshifar J. T. Oberlerchner H. Ko"glberger A., Moosbeckhofer R. (2009). Genetic diversity among isolates of *Paenibacillus larvae* from Austria. *J. Invertebr. Pathol.* **100**, 44-46.
7. Neuendorf S., Hedtker K., Tangen G., Genersch E. (2004). Biochemical characterization of different genotypes of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a honey bee bacteria pathogen. *Microbiology* **150**, 2381-2390.
8. Pentikäinen J., Kallinen E., Pelkonen S. (2009). Molecular epidemiology of *Paenibacillus larvae* infection in Finland. *Apidologie* **40**, 73-81.
9. Rauch S., Ashiralieva A., Hedtker K., Genersch E. (2009). Negative correlation between individual-insect-level virulence and colony-level virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiologic agent of American foulbrood of honeybees. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 3344-3347.

Si ringraziano i tecnici Roberta Giannasi, Marilena Abatematteo e Vanni Righetti per la collaborazione tecnica prestata.

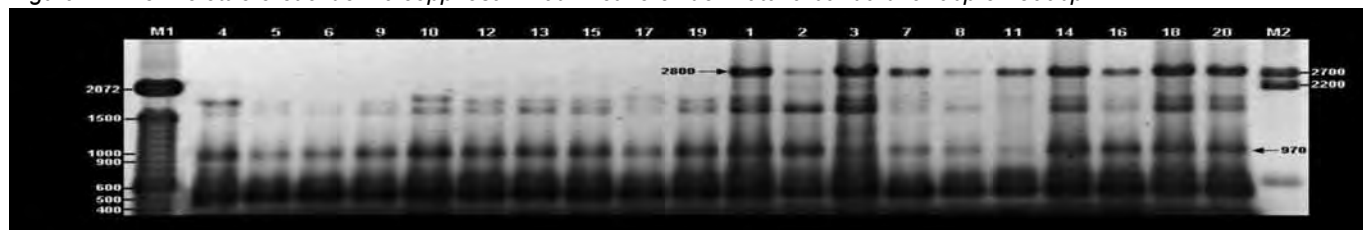
Tabella 1 - Risultati esami biochimici e biomolecolari dei ceppi con colonie a morfologia tipica.

N	Matrice	Pigmentazione	Genot. ERIC	glucosio	fruttosio	mannosio	mannitolo	maltosio	saccarosio
4	Larve	-	1	+	-	-	-	-	-
5	Larve	-	1	+	-	-	-	-	-
6	Larve	-	1	+	-	-	-	-	-
9	Detriti	-	1	+	-	-	-	-	-
10	Detriti	-	1	+	-	-	-	+	-
12	Larve	-	1	+	-	-	-	-	-
13	Detriti	-	1	+	-	-	-	-	-
15	Detriti	-	1	+	-	-	-	-	-
17	Detriti	-	1	+	-	-	-	-	-
19	Larve	-	1	+	-	-	-	-	+

Tabella 2 - Risultati esami biochimici e biomolecolari dei ceppi con colonie a morfologia atipica

	Matrice	Pigmentazione	Genot. ERIC	glucosio	fruttosio	mannosio	mannitolo	maltosio	saccarosio
1	Larve	+	2	+	+	+	+	-	-
2	Larve	+	2	+	+	+	+	-	-
3	Miele	+	2	-	+	+	+	-	-
7	Detriti	+	2	+	+	+	+	-	-
8	Larve	+	2	-	+	+	+	-	-
11	Detriti	+	2	-	+	+	+	-	-
14	Detriti	+	2	+	+	+	+	-	-
16	Detriti	+	2	+	+	+	+	-	-
18	Detriti	+	2	+	+	+	+	-	-
20	Detriti	+	2	+	+	+	+	-	-

Figura 1 - Profili elettroforetici dei 20 ceppi esaminati in cui è evidenziata la banda di 970bp e 2800bp



INDAGINE SULLA QUALITA' DELL'ACQUA DI ABBEVERATA IN SARDEGNA NEL TRIENNO 2008-2010: CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE

Bella E., Vodret B., Mancuso M. R., Caneglias E., Marongiu E.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna

Key words: livestock , water, quality

SUMMARY

Water has an important part in animal nutrition and has an essential function for regulation of body temperature, digestion, growth, reproduction, pregnancy and milk production. Nevertheless the main role of water for livestock and the problems that may arise as a result of not suitable characteristics, there is not a specific regulation about this topic and the bibliography is not enough exhaustive. The aim of this work was to evaluate water quality results in Sardinia from 2008 to 2010.

INTRODUZIONE

L'acqua è un importante, ma talvolta sottovalutato, nutriente per gli animali. Il suo ruolo essenziale è secondo solo all'ossigeno nel sostentamento e il mantenimento della produttività del bestiame; tuttavia non viene fornita all'acqua la stessa attenzione osservata nei confronti degli altri nutrienti (proteine, grassi, minerali, vitamine, etc). La quantità di acqua necessaria al sostentamento dipende dalla sostanza secca ingerita e aumenta al crescere della concentrazione salina e delle proteine nella razione. Le caratteristiche che l'acqua di abbeverata deve avere sono influenzate da diversi fattori quali la specie, l'età, la gravidanza, lo stato di lattazione, il tipo di dieta, il microclima dell'allevamento (temperatura, umidità, velocità dell'aria). L'acqua di abbeverata non ha una sua legislazione, per cui la sua qualità potrebbe essere riferita ai parametri legislativi dell'acqua potabile (1), che assicura elevati standard chimici, organolettici e batteriologici. Dai dati della letteratura si rileva una maggiore tolleranza su alcuni parametri, ad esempio i ruminanti possono bere un'acqua con un livello batteriologico maggiore rispetto all'acqua adatta per uso umano poiché provvisti di prestomaci con un'abbondante microflora e microfauna (2). In Tabella 1 sono riportati, a confronto con i parametri legislativi delle acque potabili, i valori proposti in letteratura per gli standard chimico-fisici che vengono ritenuti importanti ai fini della valutazione della qualità dell'acqua di abbeverata, superando i quali si osservano problemi in alcune specie animali (2,3,4). L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna da diversi anni esegue controlli sull'acqua di abbeverata per salvaguardare la salute e la produttività degli animali. L'obiettivo del seguente lavoro è di valutare i risultati delle analisi chimico-fisiche delle acque di abbeverata, effettuate nel triennio 2008-2010 negli allevamenti della Sardegna, con lo scopo di fare il punto della situazione sulla qualità dell'acqua destinata all'alimentazione animale nella nostra regione.

MATERIALI E METODI

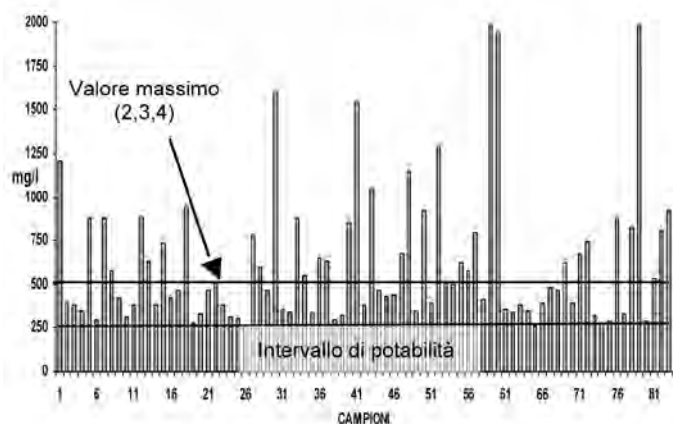
Nel triennio 2008-2010 sono stati analizzati 273 campioni di acqua per abbeverata provenienti da diverse aree della regione Sardegna. Sono stati determinati i seguenti parametri:

- pH, ammoniaca, conducibilità (5);
- sostanze organiche (ossidabilità) (6);
- durezza totale (7);
- cloruri, fluoruri, solfati, nitrati e nitriti (8).

RISULTATI

I risultati ottenuti hanno evidenziato che la maggior parte dei parametri rientra negli intervalli previsti dalla legislazione per le acque potabili, fatta eccezione per la durezza totale, la conducibilità, i cloruri e i nitrati. Nel grafico 1 sono riportate le concentrazioni dei cloruri superiori ai valori di potabilità. Molti risultati sono inferiori a 1000 mg/l, ma si osservano dei campioni, che avevano anche altri parametri al di fuori del range di potabilità, con concentrazioni intorno a 2000 mg/l.

GRAFICO 1: Valori dei cloruri superiori alla potabilità



Nel grafico 2 sono riportati i dati relativi ai campioni di acqua che hanno concentrazioni di nitrati superiori al limite di potabilità. In questo caso la maggior parte di essi ha un tenore di nitrati compreso tra 50 mg/l e 220 mg/l.

GRAFICO 2: Valori dei nitrati superiori alla potabilità

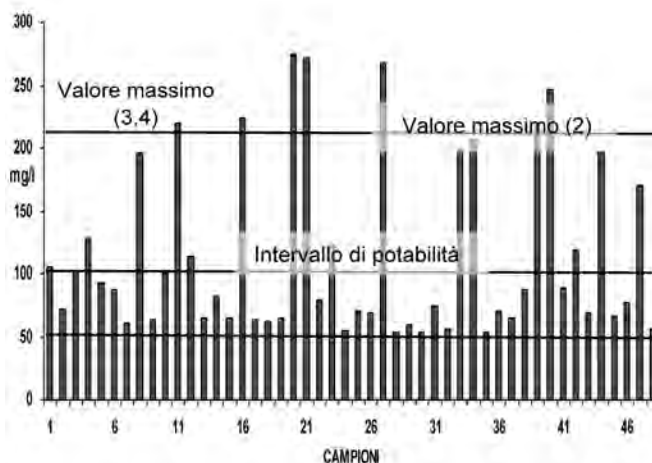


TABELLA 1: Parametri chimico-fisici delle acque di abbeverata, che possono essere causa di problemi sanitari, rispetto alle acque destinate al consumo umano.

Parametri	D. Lgs 31/2001 acque potabili (1)	Bovini - Cavalli	Polli (2)	Suini (2)
pH	6,5 - 9,5	>10,0 (2) <5,1 e >9,0 (3) <5,5 e >8,5 (4)	>10,0	>10,0
Durezza in ° F	15-50	>20 (4)	> 200	> 200
Ossidabilità	5,0 mg O ₂ /l	-	-	-
Conducibilità	2500 µS/cm a 20°C	-	-	-
NO ₃ ⁻ in mg/l	50	>100 (2) >220 (3,4)	>300	>300
NO ₂ ⁻ in mg/l	0,5	>tracce (2) >4,0 (3)	>tracce	>tracce
SO ₄ ²⁻ in mg/l	250	>500 (2) >2000 (3) >800 (4)	>500	>500
Cl ⁻ in mg/l	250	500-3000 (2)	>500	>500
F ⁻ in mg/l	1,5	>4,0 colorazione e fragilità dei denti (2) >2,4 (3)	>40	>4,0 colorazione e fragilità dei denti
NH ₄ ⁺ in mg/l	0,5	-	-	-

DISCUSSIONE

Il lavoro effettuato ha permesso di trarre diverse considerazioni. Molti campioni presentano conducibilità elevata, il che indica un alto contenuto in sali minerali, confermato a volte dalla concentrazione di uno o più anioni in essi presenti e dal valore della durezza totale, che dipende dal contenuto di bicarbonato, carbonato, solfato e ossido di calcio. Non esistono in letteratura riferimenti a rischi sanitari correlati alla conducibilità, mentre taluni autori (4) ritengono, per quanto riguarda la durezza, che valori superiori a 20°F possono portare ad una scarsa digeribilità dell'acqua stessa e ad una diminuzione dell'assorbimento intestinale degli oligoelementi presenti nella razione. Tuttavia i parametri più critici per i campioni analizzati sembrerebbero essere i cloruri e i nitrati. La conseguenza per un tenore elevato di ione cloruro è la formazione di composti tossici (clorati e cloriti) e il limite soglia per il quale si osservano problemi nei polli e nei suini è di 500 mg/l, mentre per i bovini il superamento della soglia di accettabilità di 3000 mg/l può determinare una riduzione dell'attività fermentativa ruminale (Tabella 1). Lo ione cloruro, secondo diversi autori, non è comune e una concentrazione elevata è la conseguenza di una eccessiva clorazione, ma il gran numero di acque di abbeverata con alto tenore di cloruri della regione Sardegna può essere spiegato con la vicinanza dei pozzi al mare. Considerando quanto riportato in letteratura e come evidenziato dal **Grafico 1** il limite di 500 mg/l in cloruri ridurrebbe il numero dei campioni non idonei del 57%. Per quanto riguarda i nitrati, la loro presenza è sintomo di decomposizione di materiale organico e anche un livello

moderato può provocare riduzione della crescita, aumento di infertilità e aborti, carenza di vitamina A e disturbi all'apparato digestivo. Il vero problema su cui diversi autori concordano è la trasformazione dei nitrati in nitriti, maggiormente tossici, da parte dei batteri ruminali nei bovini. I sintomi di un forte avvelenamento da nitrati e/o nitriti sono: asfissia, difficoltà respiratorie, pulsazioni accelerate, sangue che diventa scuro per la trasformazione dell'emoglobina in metaemoglobina (2,4). Nel **Grafico 2** sono riportati gli intervalli accettabili di nitrati affinché un'acqua sia considerata potabile (massimo 50 mg/l) e le concentrazioni ammissibili, secondo alcuni autori, per le acque di abbeverata: si osserva come il numero di campioni non accettabili si riduce del 66% se si prende in considerazione un valore massimo in nitrati di 100 mg/l. Alla luce delle precedenti considerazioni, si può sottolineare che la maggior parte delle acque di abbeverata, da noi analizzate, presentano delle caratteristiche chimico-fisiche che, pur avendo alcuni parametri superiori ai valori di potabilità, possono essere utilizzate per l'alimentazione animale. Infatti solo in pochissimi casi sembrano presentare dei valori che possono essere causa di problemi sanitari se confrontati con i dati riportati in letteratura. Tuttavia, vista l'importanza dell'acqua di abbeverata nell'alimentazione degli animali, a nostro parere, la mancanza di norme specifiche a riguardo e le indicazioni, talora discordanti in letteratura, non garantiscono informazioni sufficienti sull'utilizzo di un'acqua adatta al consumo da parte degli animali. Il presente studio evidenzia la necessità di un maggiore approfondimento sulle problematiche ad essa correlate.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Decr. L.vo 02/02/2001 n. 31 Attuazione della Dir. 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano.
- 2) Mecella (2001), Metodi di analisi delle acque per uso agricolo e zootecnico. Ed. FrancoAngeli.
- 3) David K. Beede (2005), The Most Essential Nutrient: Water, Proceedings of the 7th Western Dairy Management Conference, March 9-11,2005, Reno. NV
- 4) Gastaldo A., Rossi P. (2006), Le caratteristiche che deve avere l'acqua di abbeverata, Supplemento a L'Informatore Agrario 29/2006.
- 5) D.M. del 23.03.2000 - S.O. n.60 alla G.U. n. 87 del 13.04.2000, Approvazione dei "Metodi ufficiali di analisi delle acque per uso agricolo e zootecnico".
- 6) Metodi analitici ufficiali per le acque destinate al consumo umano ai sensi del D.Lgs. 31/2001. ISS, Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria Reparto di Igiene delle Acque Interne. www.iss.it.
- 7) IRSA CNR n.2040, Quaderno n°100/94.
- 8) Official Method of Analysis of A.O.A.C. International 1995 XVI ed. 993.30-1993

PRESENZA DI *E. COLI*/VTEC IN CARNI E SALUMI DI CERVO

¹Bilei S., ¹De Santis P., ³Bichi G., ¹Flores Rodas E. M., ¹Greco S., ¹Tolli R., ²Morabito S., ¹Pecchi S.,
¹Scaramella L., ²Caprioli A.

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma

²Laboratorio Nazionale di Riferimento (LNR) *E. coli* – Istituto Superiore di Sanità (ISS)

³Servizio Veterinario ASL 8 Arezzo

Key word: *Escherichia coli* VTEC, salumi di cervo, salute pubblica

ABSTRACT

The aim of this work is to describe the laboratory analysis results on samples of frozen deer meat and salami made from venison, gathered as a result of the VTEC alert.

The presence of VTEC in this meat raises an important issue, especially in the case of direct transfer of it from hunters to restaurants, avoiding health check.

The aim of this work is to describe a case of *Escherichia coli* VTEC, isolated in deer meat products during the controls established as consequence of the *E. coli* O:104 outbreak occurred in Europe in summer 2011. A sample of frozen deer meat and products derived from it (salami, sausages and "spianata") were found positive by real-time PCR to verotoxins and intimine genes. The laboratory results are described and some considerations are made in regards to health risk deriving from venison consumption.

INTRODUZIONE

Escherichia coli (*E. coli*) verocitotossici, portatori dei geni di virulenza *vtx1*, *vtx2* e *eae* (VTEC), sono causa di infezioni intestinali sia nell'uomo che negli animali e possono provocare gravi patologie con sintomi che variano dalla diarrea senza complicazioni alla colite emorragica con forti dolori addominali e diarrea sanguinolenta, fino ad arrivare alla complicazione più grave, ad esito talvolta infausto, della sindrome uremico-emolitica (SEU). L'uomo può contrarre l'infezione attraverso il consumo di cibo o acqua contaminati, la trasmissione diretta da persona a persona, il contatto con animali infetti. Il principale serbatoio di questa zoonosi è rappresentato dal bovino (2), ma svolgono un ruolo nella trasmissione anche l'ovino, il caprino e vari erbivori selvatici. Il batterio, che si localizza nell'apparato digerente, viene eliminato nell'ambiente esterno attraverso le feci.

La maggior parte dei casi descritti a livello mondiale è attribuibile al sierotipo O157:H7 anche se negli ultimi anni si è registrato un incremento di infezioni sostenute da ceppi enteroemorragici (EHEC) appartenenti a diversi sierogruppi, tra i più frequenti: O26, O111, O103 e O145. Il Report sulle Zoonosi pubblicato dall'EFSA nel 2011 relativo all'anno 2009, riferisce che il 51,7% dei casi nell'uomo è sostenuto da *E. coli* O157, il 28,2% è risultato non tipizzabile, il 20,8% da altri sierogruppi. (5). Il 2009, con un totale in Europa di 3.573 casi confermati di VTEC nell'uomo, ha fatto registrare un incremento del loro numero del 13,1% rispetto all'anno precedente, sottolineando quindi la sua rilevanza in salute pubblica (5).

Nell'estate del 2011, è stato registrato un importante episodio tossinfettivo causato da *E. coli* O:104 verocitotossico che ha coinvolto vari paesi europei. Durante le indagini epidemiologiche attivate in Germania per la determinazione della fonte del focolaio tossinfettivo, inizialmente segnalato a fine maggio, nel mese di giugno una seconda allerta è stata attivata a seguito della presenza di *E. coli* VTEC in

un salame di cervo, prelevato nel corso dell'attività di vigilanza in un mercato locale austriaco e prodotto presso uno stabilimento toscano.

A seguito dell'allerta, un campione di salume dello stesso lotto, è stato prelevato presso lo stabilimento di produzione ed inviato all'European Reference Laboratory for *E. coli* VTEC (EU-RL), presso l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) che non ha confermato la precedente positività.

L'azienda produttrice ha provveduto ad attivare le procedure di rintracciabilità del prodotto per il suo ritiro e/o richiamo dal commercio. Nello stesso tempo l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana ha ricevuto campioni di carne di cervo congelata dello stesso lotto risultato positivo, di provenienza polacca, commercializzata da un fornitore olandese e trasformata in Italia. Ugualmente sono stati analizzati i corrispondenti prodotti di trasformazione: salsiccia, salame e spianata.

Scopo di questo lavoro è quello di rappresentare i dati analitici derivanti dall'attività di laboratorio su campioni di polpa di cervo congelata e di salumi a base di carne di cervo, pervenuti a seguito dell'allerta *E. coli* VTEC.

MATERIALI E METODI

Nel mese di giugno 2011, 4 campioni, 1 di carne di cervo congelata, 1 di salame, 1 di salsiccia e 1 di spianata prodotti dal medesimo salumificio toscano, sono stati conferiti all'IZSLT di Roma, a seguito di un campionamento ufficiale del Servizio Veterinario della ASL 8 di Arezzo.

Su tutti i campioni prelevati in aliquote uniche costituite da 5 unità campionarie ciascuna, è stato richiesto di accertare la presenza di *E. coli* verocitotossici.

La ricerca microbiologica di *E. coli* O:157 è stata condotta secondo ISO 16654:2001, mentre per i sierogruppi (O:26, O:145, O:111, O:103; O:104) è stato applicato il protocollo fornito dall'EU-RL che prevede l'impiego del terreno colturale Buffered Pepton Water (BPW) meno selettivo rispetto a quello indicato dalla succitata ISO, modified Tryptone Soya Broth (mTSB). I brodi di prearricchimento sono stati analizzati mediante PCR real-time per i geni *vtx1*, *vtx2* e *eae*. I campioni risultati positivi per uno dei fattori di patogenicità sono stati esaminati mediante diversi metodi PCR real-time, per l'individuazione di 5 dei sierotipi più frequentemente coinvolti in episodi di tossinfezione nell'uomo (O:157, O:145, O:111, O:104, O:26, O:103) con l'aggiunta del sierotipo O:104 oggetto di studio. Dai brodi di prearricchimento risultati positivi per i fattori di patogenicità, mediante immunoseparazione magnetica (Dynea beads® O:145, O:26, O:111, O:103), sono state allestite ulteriori colture in terreno solido Cefixime Tellurite MacConkey Agar contenente sorbitolo (CT-SMAC) e Sorbitol MacConkey Agar (SMAC). Le colonie di *E. coli* così ottenute, sono state sottoposte a PCR real-time per confermare la presenza dei geni di virulenza e individuare il sierotipo di appartenenza.

I ceppi risultati positivi sono stati successivamente inviati all'EU-RL per ulteriori indagini di laboratorio incluso il test di citotossicità su cellule VERO, oltre che l'appartenenza ad ulteriori sierogruppi.

RISULTATI

La ricerca dei geni di virulenza e l'identificazione dei sierotipi, a partire dal brodo di prearricchimento sul campione di polpa congelata, ha fornito esito positivo per i geni *eae*, *vtx1* e *vtx2*. I sierotipi identificati mediante PCR real-time corrispondevano a O:145 e a O:104. Dalle colonie di *E. coli* derivanti dal corrispondente brodo di prearricchimento, sono stati messi in evidenza i geni di virulenza *eae* e *vtx2* e il solo sierotipo O:145. L'EU-RL ha confermato la positività per il gene *vtx2* e la tossicità su cellule VERO per 2 delle 3 unità campionarie saggiate mentre l'assegnazione al sierotipo, è risultata positiva per O:8. La terza unità campionaria è risultata positiva solamente per il gene *eae* e negativa al saggio di tossicità su cellule VERO. In questo caso non è stato possibile individuare il sierotipo di appartenenza.

I prodotti di trasformazione della carne di cervo, hanno dato i seguenti risultati: a) salame di cervo, presenza di geni *vtx2* ed *eae*, sierotipi identificati O:104 e O:26; b) spianata di cervo, presenza di geni *vtx2* ed *eae*, nessun sierotipo identificato. Tali risultati, non sono stati confermati dall'EU-RL, mediante il saggio di citotossicità su cellule VERO; c) salsiccia di cervo, presenza del gene *vtx2* a partire dal brodo di prerarricchimento ma nessun sierotipo identificato e nessun ceppo di *E. coli* VTEC isolato.

La Tabella 1 riassume i risultati riferiti.

DISCUSSIONE

A seguito del recente focolaio epidemico causato da *E. coli* VTEC O:104 e la successiva allerta partita dall'Austria, a causa della positività riscontrata su un campione di salame di cervo mediante indagini esclusivamente molecolari, è scaturita la necessità di disporre di metodi molecolari accreditati per la ricerca di *E. coli* VTEC. In questo caso questi stessi metodi si sono rivelati utili per una rapida identificazione dell'agente eziologico del focolaio epidemico e, data la difficoltà d'isolamento del germe, per l'identificazione del pericolo nell'alimento indipendentemente dai trattamenti da esso subiti e dalle condizioni di vitalità degli agenti patogeni.

A spiegazione dei risultati ottenuti è possibile formulare alcune considerazioni:

- il riscontro dei fattori di virulenza non seguito dall'isolamento colturale del germe, potrebbe essere ascrivibile alla presenza di flora lattica competitiva nei salumi sottoposti a stagionatura, che creano condizioni sfavorevoli alla crescita e allo sviluppo della flora patogena. Non avendo proceduto, in questo lavoro, ad analizzare il processo produttivo e l'andamento effettivo dei batteri lattici per questa tipologia di prodotti, è d'obbligo far riferimento alla bibliografia disponibile. Diversi studi (1,3), infatti, sono stati condotti sulla competitività delle flore lattiche nei confronti dei batteri patogeni, in particolare sulla produzione di batteriocine da parte dei lattobatteri. La cinetica dei microrganismi dipende, infatti, dallo stato fisiologico degli stessi, dall'interazione fra le varie popolazioni di batteri lattici presenti nella matrice alimentare e la conseguente produzione di metaboliti e da altre caratteristiche dell'alimento stesso, quali pH, aw, disponibilità di ossigeno, presenza di sostanze nutritive ecc. (3).

- Il riscontro della presenza dei geni di virulenza che caratterizzano i ceppi di *E. coli* VTEC, ma l'assenza di un ceppo vitale, potrebbe essere indicatore della presenza pregressa nella materia prima dell'agente patogeno ma anche della sua successiva inattivazione durante il processo di lavorazione e di stagionatura;
- la presenza di un sierogruppo (O:8) di *E. coli* VTEC isolato raramente, potrebbe essere ascrivibile all'introduzione di sierogruppi di *E. coli* estranei alla flora autoctona;
- lo scenario potrebbe, inoltre, essere complicato dalle pratiche commerciali che prevedono lo spostamento delle merci all'interno dei paesi europei, con complicate triangolazioni prima di raggiungere la destinazione finale;
- in conseguenza della positività, desta preoccupazione la pratica della vendita diretta della selvaggina da parte dei cacciatori ai ristoratori. Il ruolo dei ruminanti selvatici quali ospiti naturali del patogeno è considerato molto importante anche dal Regolamento (CE) 853/2004 che prevede l'esame ispettivo veterinario delle carcasse. Lo stesso Regolamento non si occupa però della selvaggina destinata alla cessione diretta (4). Per colmare questa lacuna, il 9 febbraio 2006 la Conferenza Stato-Regioni ha stilato due accordi, il 2470 e il 2477, che trattano della cessione diretta e dell'obbligo della tracciabilità dei selvatici. Nonostante gli sforzi, non tutti i Servizi sembrano possedere tuttora sufficienti strumenti per il controllo di questo particolare aspetto. Necessaria risulta inoltre, l'applicazione della normativa di riferimento per quanto riguarda la commercializzazione dei capi cacciati. La cessione diretta, infatti, prevede il contatto diretto fra il cacciatore e il consumatore finale, che può essere anche un ristorante locale o un esercizio al dettaglio che possiede le strutture idonee a compiere la scuoiatura e il sezionamento della carcassa secondo norme igieniche (4). Lo scopo di tale normativa, infatti, è quello di cercare di porre sotto un minimo controllo il consumo di animali cacciati.

Tabella 1. Risultati prodotti a base di carne di cervo

MATRICE	CAMPIONE	CAMPI	EAE	VTX1	VTX2	O:157	O:145	O:111	O:104	O:26	O:148	O:113	O:8	O:91	Cellule VERO-vtx2
Brodo di prearricchimento	POLPA DI CERVO	1	+	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
		2	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	
		3	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	
		4	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	
		5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Da colonie in pool	POLPA DI CERVO	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Brodo di prearricchimento	SALAME DI CERVO	1	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
		2	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
		3	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
		4	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
		5	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
Da colonie in pool	SALAME DI CERVO	pool	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
Brodo di prearricchimento	SPIANATA DI CERVO	1	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		4	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
		5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Da colonie in pool	SPIANATA DI CERVO	pool	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Brodo di prearricchimento	SALSICCIA DI CERVO	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		2	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
		3	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
		4	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
		5	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Da colonie in pool	SPIANATA DI CERVO	5	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	

BIBLIOGRAFIA

1. Boni P, Colombo S, Bonometti E (1996) Presenza di *Escherichia coli* O157:H7 (VTEC) in alimenti di origine animale, Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie, Perugia, 25-28 settembre
2. Caprioli A., Conedera G., Lucangeli C. (2005). *Escherichia coli* O157 e altri *E. coli* Enteroemorraggici.: Trattato sulle infezioni e tossinfezioni alimentari, Rondinelli E.G, Fabbì M, Marone P. (Eds). Pavia: Selecta Medica.
3. Cosciani Cunico, E., Boni, P., Baranyi, J.(2009) Sviluppo di una banca dati per la microbiologia alimentare e validazione di modelli predittivi sulla cinetica di microorganismi patogeni in prodotti italiani a base di latte e di carne. Doctoral thesis. Università degli Studi di Parma, Dipartimento di Sanità Pubblica. Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (Brescia), Dipartimento di Sicurezza Alimentare Institute of Food Research (Norwich), Computational Microbiology Research Group.
4. Mauri, G. 2011 "Filiera selvaggina cacciata-consumo" - La settimana veterinaria n.746 29 giugno 2011. Pag. 10.
5. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2009, The EFSA Journal (2011),9(3):2090

CARATTERIZZAZIONE GENOTIPICA E FENOTIPICA DI CEPPI DI *SALMONELLA* TYPHIMURIUM ISOLATI DA SINDROMI GASTROENTERICHE IN VITELLI BUFALINI

Borriello G.¹, Pesciaroli M.², Lucibelli M. G.¹, Cerrone A.¹, Riccone N.¹, Paradiso R.¹, Ammendola S.³, Graziani C.², Battistoni A.³, Pasquali P.², Galiero G.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Dipartimento di Sanità Animale, Portici (NA); ²Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, ³Roma; Dipartimento di Biologia, Università di Tor Vergata, Roma

Key words: *Salmonella*, water buffalo

SUMMARY

Fourteen isolates of *S. Typhimurium* isolated from diarrhoeic water buffalo calves were genotyped by PCR detection of virulence genes. The isolates exhibited 10 different genetic profiles. The pathogenicity of the most representative 3 strains was tested in vivo. The most pathogenic strain could be differentiated by the others for the presence of the locus *agfA* coding for a fimbrial adhesion factor. These results suggest a possible key role of this fimbria in the pathogenesis of salmonellosis and might contribute to a better understanding of the role of this pathogen in the aetiology of diarrhoea in water buffalo calves.

INTRODUZIONE

Le malattie indotte nel vitello bufalino dai microrganismi appartenenti al genere *Salmonella* si caratterizzano per l'elevata morbi-mortalità e per la sintomatologia che, sebbene talvolta sia di tipo sistemico per il coinvolgimento di articolazioni, polmoni e tessuto cerebrale, sempre si contraddistingue per la seria compromissione del tratto gastroenterico con diarrea e conseguente grave disidratazione (5). In Italia sono riportati isolamenti di varie serovars, ma nessun sierotipo di *Salmonella* sembra essere ospite-adattato al bufalo. Durante la nostra quotidiana attività diagnostica, tuttavia, si isolano con maggiore frequenza *S. Typhimurium* e *S. Muenster*, e si osserva che ad essere colpiti sono soprattutto i soggetti di 1-12 settimane di età. Definire la patogenicità per la specie bufalina di questo sierotipo non è compito semplice, poiché l'importanza dei quadri clinici e delle lesioni anatomico-patologiche riscontrati in corso di salmonellosi da *S. Typhimurium* possono alquanto variare in termini di gravità, e questo può dipendere dall'interazione ospite-patogeno, la quale è senz'altro influenzata dalla via di ingresso, dalla dose infettante, dalla naturale o acquisita resistenza dell'ospite e dalla eventuale compartecipazione di altri agenti eziologici (5). Nondimeno, un ruolo fondamentale nel determinare la gravità della malattia, potrebbe essere legato alla differente virulenza del sierotipo coinvolto. Il presente lavoro intende effettuare una caratterizzazione genotipica di vari ceppi di *S. Typhimurium* isolati in corso di patologia enterica in vitelli bufalini e, per alcuni di essi, anche una valutazione fenotipica. Allo scopo sono stati ricercati specifici geni che codificano per diversi fattori di patogenicità ed inoltre sono state condotte prove di competizione nel topo tra alcuni dei virulotipi in esame.

MATERIALI E METODI

Ceppi batterici e metodi diagnostici

Lo studio è stato condotto nella regione Campania, durante gli anni 2006 – 2007, su 191 vitelli bufalini, di età compresa tra 1 e 12 settimane, affetti da sindrome gastroenterica. Le feci di tali animali sono state raccolte e testate per la presenza di *Salmonella* spp. mediante metodo microbiologico (10).

Le salmonelle isolate sono state sierotipizzate secondo lo schema di Kaufmann-White l'identificazione e' stata confermata dal Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi (IZSVE).

Estrazione del DNA e metodi molecolari

Il DNA batterico è stato estratto da 1 ml di coltura utilizzando la

resina Chelex 100 (BioRad) e analizzato per la presenza dei geni elencati in Tabella 1 mediante PCR.

Tab. 1 - Geni di *Salmonella* ricercati mediante PCR

Prodotto genico	Gene ^a	Primers 5' – 3'	bp
fattore di virulenza	<i>gipA</i> (7)	GCAAGCTGTACATGGCAAAG GGTATCGGTGACGAACAAAT	212
fattore di virulenza	<i>gogB</i> (4)	GCTCATCATGTTACCTCTAT AGGTTGGTATTCCCATGCA	598
fattore di virulenza	<i>sopE</i> (4)	CGAGTAAAGACCCCGCATAC GAGTCGGCATAGCACACTCA	363
fattore di virulenza	<i>gtgB</i> (7)	TGCACGGGGAAAACTACTTC TGATGGGCTGAAACATCAAA	436
fattore di virulenza	<i>sspH1</i>	TGCAGAAAAAGGGGAATACG GCAGCCTGAAGGTCTGAAAC	246
fattore di virulenza	<i>sspH2</i>	GCACAACCTGGCTGAAGATGA TTTCCCAGACGGAACATCTC	203
fattore di virulenza	<i>gtgE</i> (1)	AGGAGGAGTGTAAGGT GTAGAACTGGTTTATGAC	1114
fattore di virulenza	<i>sodC1</i> (1)	TATTGTCGCTGGTAGCTG CAGGTTTATCGGAGTAAT	468
plasmide di virulenza	<i>spvC</i> (2)	ACTCCTTGACAAACCAATGCGGA TGCTTCTGCATTTCGCCACCATCA	571
cromosoma	<i>invA</i> (2)	ACAGTGCTCGTTTACGACCTGAAT AGACGACTGGTACTGATCGATAAT	244
fimbria	<i>stfE</i>	ATTTGGCAATGTGTTGACGA TTTGACACGGATACCCAAT	185
fimbria	<i>safC</i>	CTCGCTGTCTTGAAGTGA CACCGTGTGATGGTGAAGTC	158
fimbria	<i>csgA</i>	GGATTCCACGTTGAGCATT CGGAGTTTTTACGCTTCCAC	212
fimbria	<i>ipfD</i>	TTCCCTCAATACGCAGGAAG CTCAGGGCTGTGAAGTCTCC	183
fimbria	<i>bcfC</i>	CAGCTTTTCATGACGCGATA CAATGTCTCTGTTGCGAGA	241
fimbria	<i>stbD</i>	GGCTGTAATATTGCGCGGTA GCACGCCCTATTCCAGTAA	201
fimbria	<i>pefA</i> (9)	ACACGCTGCCAATGAAGTGA ACTGCGAAAGATGCCACAGA	450
fimbria	<i>fimA</i>	CCTTTCTCCATCGTCTGAA TGGTGTTATCTGCCTGACCA	85
fimbria	<i>agfA</i> (9)	GGATTCCACGTTGAGCATT GTTGTTGCCAAAACCAACCT	312

^a Dove non è riportata la referenza, i primer e i protocolli di PCR sono stati messi a punto dagli autori

I protocolli di PCR sono stati condotti come descritto in letteratura (1, 2, 4, 6, 7, 9). Dove non è riportata la referenza, i primer sono stati disegnati dagli autori utilizzando il software Primer3 e le reazioni di PCR sono state effettuate in un volume finale di reazione di 25 ml contenente HotStar Taq Master Mix (QIAGEN) 1 X, 0.4 mM di ogni

primer e 1 ml di DNA. I profili termici includevano una fase iniziale di denaturazione a 95°C per 15 minuti, seguiti da 35 cicli a 95°C per 30 secondi, Tx per 30 secondi e 72°C per 1 min, e una fase finale di estensione a 72°C per 5 min. La temperatura di annealing Tx era 50°C per i geni *sodC1* e *gtgE*, e 58 °C per gli altri geni. I prodotti di amplificazione sono stati risolti mediante elettroforesi su gel di agarosio al 3% e visualizzati ai raggi UV dopo colorazione con SYBRsafe (Invitrogen).

Prove di competizione in vivo nel topo

Tre differenti ceppi di *S. Typhimurium* (*S. Typhimurium* # 16, *S. Typhimurium* # 92, *S. Typhimurium* # 112) sono stati utilizzati per condurre delle infezioni miste nel topo secondo il metodo descritto da Beuzon e Holden (3). Brevemente, 200 µl di sospensioni batteriche contenenti alternativamente due dei tre ceppi in esame nella proporzione di 1:1, sono state inoculate per via intraperitoneale (2×10^4 /topo) o per via orale (2×10^7 /topo) in femmine di topi BALB/c di 8-10 settimane di età. A 4 (ip) e 7 (os) giorni dall'infezione, la milza, asetticamente rimossa, e' stata omogenata in soluzione salina. L'entità della colonizzazione splenica dei 2 ceppi posti in competizione e' stata valutata sfruttando le naturali resistenze antibiotiche precedentemente determinate per ciascun ceppo. Diluizioni seriali della risultante sospensione cellulare splenica sono state seminate in doppio su piastre Triptone Agar (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) contenenti appropriati antibiotici.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Dei 191 vitelli bufalini esaminati, 62 (32.5%) sono risultati positivi alla ricerca di *Salmonella* spp. mediante metodo colturale. Tutti i ceppi di *S. Typhimurium* raccolti nel presente studio sono stati isolati in corso di patologia ed in assenza di altri agenti eziologici (*E. coli*, *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., coronavirus, rotavirus e *C. perfringens*) causa di sindrome gastroenterica nel vitello bufalino. Tali isolati sono stati ulteriormente tipizzati mediante metodo molecolare andando a ricercare geni i cui prodotti plausibilmente svolgono un ruolo nella patogenicità del batterio. In particolare, i loci *gipA*, *gtgB*, *sopE*, *sodC1*, *gtgE*, *gogB*, *sspH1* e *sspH2*, sono geni di origine fagica che codificano per fattori di virulenza (1,2,4,6,7); Il gene *spvC* è situato su un noto plasmide di virulenza (2), mentre i geni *stfE*, *saFC*, *csgA*, *ipfD*, *bfcC*, *stbD*, *pefA*, *fimA* e *agfA* codificano per dei fattori di adesione (fimbrie) necessari per indurre e sostenere la sindrome gastroenterica (5). Il gene cromosomico *invA* è stato invece amplificato per ogni isolato come controllo positivo del DNA nelle reazioni di PCR.

Sulla base dei 18 loci analizzati, in funzione della presenza/assenza dei geni ricercati, i 14 ceppi di *S. Typhimurium* hanno mostrato 10 genotipi diversi. Questo risultato conferma l'estrema variabilità presente nell'ambito del sierotipo Typhimurium (4,7) ed evidenzia il grande potere discriminante della genotipizzazione effettuata.

Tra gli isolati di *Salmonella* raccolti sono stati scelti 3 ceppi per le successive prove di competizione *in vivo* nel topo. A tale scopo sono stati testati i due ceppi che esibivano rispettivamente il maggiore (ceppo # 92) e il minore (ceppo # 112) numero di fattori di virulenza, ed un ulteriore ceppo (# 16) con un corredo genotipico simile al ceppo # 92, senza però il locus *agfA*. I risultati delle prove di competizione indicano che il ceppo # 92 (ovvero quello con il maggior numero di fattori di virulenza) risulta essere il più virulento di quelli considerati. I risultati di questo studio consentono di chiarire alcuni aspetti della salmonellosi bufalina. In primo luogo, la prevalenza di *Salmonella* spp. in vitelli bufalini affetti da sindrome gastroenterica appare significativa, essendo stato isolato tale patogeno nel 32.5% dei casi. Inoltre, la distribuzione dei sierotipi nell'ambito di questa specie animale appare estremamente variabile, con una maggiore prevalenza di *S. Typhimurium* (23%), *S. Muenster* (11%)

e *S. Give* (10%). Questi dati confermano l'assenza di un sierotipo specificamente adattato alla specie bufalina (5).

La sindrome gastroenterica indotta da *Salmonella* è tra le principali cause di mortalità nei vitelli bufalini, pertanto, una corretta caratterizzazione degli isolati e' cruciale nella prevenzione e nel controllo degli episodi infettivi. La caratterizzazione genotipica condotta in questo studio ha confermato la variabilità genetica dei ceppi, mostrando una capacità di discriminazione nell'ambito del sierotipo *S. Typhimurium* del 71%. Le prove di competizione *in vivo* nel topo confermano inoltre la variabilità fenotipica di questo patogeno. L'analisi dei profili genetici esibiti dai ceppi inclusi nelle prove *in vivo* evidenzia che il ceppo più virulento si distingue dagli altri per la presenza di un numero elevato di fattori di virulenza e del gene *agfA*, codificante per un fattore di adesione fimbriale ("aggregative fimbria A"). Sulla base di questi dati, è ipotizzabile che tale fimbria svolga un ruolo essenziale nell'induzione della sindrome gastroenterica, aumentando pertanto il potere patogeno del batterio portatore. Altri studi, tuttavia, saranno necessari per escludere la possibilità che le differenze fenotipiche osservate tra i ceppi in esame non dipendano in realtà da altri fattori di virulenza non inclusi in questo studio. In conclusione, la tipizzazione molecolare effettuata ha mostrato di fornire utili informazioni in merito alla virulenza di *Salmonella*, e la sua applicazione potrebbe contribuire ad una migliore comprensione del ruolo di questo patogeno nell'eziologia della sindrome gastroenterica nel vitello bufalino.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- 1) Bacciu D, Falchi G, Spazziani A, Bossi L, Marogna G, Sisinnio Leori G, Rubino S, Uzzau S. 2004. Transposition of the heat-stable toxin astA gene into a Gifsy-2-related prophage of *Salmonella enterica* serovar abortusovis. *J of Bacteriol* 186:4568-4574.
- 2) Chiu CH, Ou JT. 1996. Rapid identification of salmonella serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. *J Clin Microbiol* 34:2619-2622.
- 3) Beuzón CR, Holden DW. 2001 Use of mixed infections with *Salmonella* strains to study virulence genes and their interactions in vivo. *Microbes Infect* 3:1345-52.
- 4) Drahovska H, Mikasova E, Szemes T, Ficek A, Sasik M, Majtan V, Turna J. 2007. Variability in occurrence of multiple prophage genes in *Salmonella Typhimurium* strains isolated in Slovak Republic. *FEMS Microbiol Lett* 270:237-244.
- 5) Fagiolo, A., Roncoroni, C., Lai, O., Borghese, A., 2005 Buffalo pathologies. In: Borghese, A. (Ed.), Buffalo Production and Research, FAO Regional Office for Europe Inter-Regional Cooperative Research Network on Buffalo, Rome, pp. 249-296.
- 6) Heithoff DM, Shimp WR, Lau PW, Badie G, Enioutina EY, Daynes RA, Byrne BA, House JK, Mahan MJ. 2008. Human *Salmonella* clinical isolates distinct from those of animal origin. *Appl Environ Microbiol* 74:1757-1766.
- 7) Mikasova E, Drahovska H, Szemes T, Kuchta T, Karpiskova R, Sasik M, Turna J. 2005. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains of veterinary origin by molecular typing methods. *Vet Microbiol* 109:113-120.
- 8) Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. 1994. Clinical Veterinary Microbiology. Mosby Year Book Europe, London, p.191-236.
- 9) Smith KP, George J, Cadle KM, Kumar S, Aragon SJ, Hernandez RL, Jones SE, Floyd JL, Varela MF. (2010) Elucidation of antimicrobial susceptibility profiles and genotyping of *Salmonella enterica* isolates from clinical cases of salmonellosis in New Mexico in 2008. *World J Microbiol Biotechnol*. 26:1025-1031.
- 10) Norma UNI EN ISO 6579:2002, Annex D "Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from primary production stage".

FOCOLAI DI BOTULISMO AVIARE NEL LAZIO: DATI PRELIMINARI

Bossù T., Eleni C., De Liberato C., Di Egidio A., Magliano A., Grifoni G., De Santis P., De Angelis V., Di Domenico I., Scaramozzino P., Bilei S.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma

KEYWORDS: *Clostridium botulinum*, Botulismo aviare, riserve naturali

SUMMARY

Since 2008 to 2010, 7 type C avian botulism outbreaks occurred in the Lazio region (Central Italy): 3 outbreaks in 2008, 2 in 2009 and 2 in 2010. All the outbreaks started in late summer and finished in late autumn, with many species of waterfowl involved. In the 2008 outbreaks, 18 out of 23 dead or symptomatic birds were positive for neurotoxins of type C *Clostridium botulinum*, in the outbreaks of 2009, 9 out of 17 and in 2010, 11 out of 14 birds.

INTRODUZIONE

Il botulismo è riconosciuto come una delle principali cause di mortalità negli uccelli sin dai primi del 1900. In particolare, il botulismo di tipo C ha causato storicamente numerosi focolai in uccelli acquatici nei laghi degli Stati Uniti ed in Europa, Italia compresa, mentre più sporadici sono risultati gli episodi attribuibili a botulismo di tipo E. Il numero di uccelli che annualmente muoiono nel mondo per botulismo è stimato in parecchi milioni. La parte occidentale degli Stati Uniti ed il Canada risultano particolarmente colpiti, con episodi ricorrenti spesso nelle medesime zone umide; morie anche di 50.000 esemplari sono la norma, mentre nel 1997 nel solo lago canadese di Old Wives sono state registrate oltre un milione di morti nell'avifauna. Storicamente i focolai registrati al di fuori del continente americano sono risultati di minore entità, tuttavia negli ultimi venti anni si è assistito ad un aumento della loro frequenza. Quali siano le cause di tale aumento non è noto. La tossina botulinica di tipo C è letale per gli uccelli in generale, ma colpisce particolarmente l'avifauna di ambienti umidi, soprattutto anatidi, oche, ma anche limicoli, laridi ed ardeidi. Tra i mammiferi, risultano sensibili roditori, bovini e cavalli. Nell'uomo, il cui organismo è considerato resistente alla tossina di tipo C, a tutt'oggi risultano segnalati due casi. La tossina di tipo E, normalmente riscontrata nei pesci, è invece potenzialmente patogena per l'uomo, ma fortunatamente termolabile.

Nel presente lavoro vengono riportati i dati preliminari relativi ad episodi di botulismo aviare di tipo C verificatisi nel Lazio tra il 2008 ed il 2010.

MATERIALI E METODI

Nel 2008 sono stati registrati tre focolai: lago di Albano (Parco Naturale dei Castelli Romani) e Tenuta Presidenziale di Castel Porziano in provincia di Roma e laghi Lungo e Ripasottile, riserva naturale in provincia di Rieti, con diverse specie di uccelli colpite (anatidi, garzette, gabbiani, ecc.). Nel 2009, sempre nel periodo estivo autunnale, episodi attribuibili a botulismo C si sono verificati nelle Riserve Naturali di Torre Flavia e Macchiatonda (Rm) e ancora nella Tenuta Presidenziale di Castel Porziano e al lago di Albano. Nel 2010 gabbiani morti per botulismo C sono stati rinvenuti presso la riserva naturale di Tor Caldara (Rm), il litorale di Anzio ed il lago di Bracciano. I campioni pervenuti o raccolti nel corso di sopralluoghi, suddivisi per anno e per zona di provenienza, sono riassunti in

Tabella.1. Nel 2008 sono stati condotti sopralluoghi da parte di personale dell' IZSLT al Lago di Albano ed ai laghi Lungo e Ripasottile, nel corso dei quali sono stati campionati oltre che carcasse di uccelli, anche larve di ditteri saprofiti (bigattini) presenti sulle stesse e terriccio in loro prossimità, al fine di sottoporre i suddetti campioni alla ricerca di tossina botulinica. Sono stati rilevati, tramite sonda, pH, temperatura e ossigeno disciolto nell'acqua in diversi punti, allo scopo di verificare le condizioni ambientali idonee allo sviluppo ed alla circolazione della tossina botulinica. Durante i picchi epidemici il costante monitoraggio delle aree colpite, ad opera anche dei guardia parco, ha consentito di osservare anche animali sintomatici, che, successivamente venuti a morte sono stati conferiti al laboratorio.

Gli uccelli sintomatici presentavano incapacità di volare, paralisi flaccida degli arti, opistotono, difficoltà respiratorie e paralisi della membrana nittitante. Sui soggetti rinvenuti morti o sintomatici preagonici e successivamente deceduti, è stato effettuato l'esame anatomopatologico ed il prelievo del fegato e dell'intestino per la ricerca della tossina; sono stati inoltre effettuati esami batteriologici, virologici e tossicologici per escludere altre cause di morte.

Per la ricerca e l'identificazione della tossina botulinica sono state utilizzate la prova biologica, secondo il metodo descritto dal CDC (1), ed una PCR Multiplex con successiva analisi elettroforetica in gel di agarosio dei prodotti, per la contemporanea identificazione delle diverse tipologie di botulino (A-B-C-D-E-F) (2).

Tabella.1 - Campioni analizzati per tossina botulinica nei diversi focolai

Anno	2008			2009			2010	
Zona	Ri*	Al*	CP*	Mt*	TF*	Al	TC*	Br*
Specie/matrice	N° Campioni							
Germano reale	4	4				2		
Folaga	4							
Moriglione	1							
Moretta	3							
Gabbiano		3	7	14		1	28	4
Airone	1							
Oca		1						
Garzetta					1			
<i>Lucilia</i> sp.		4			1			
<i>Sarcophaga</i> sp.		2						
<i>Musca</i> sp.		1						
<i>Fannia</i> sp.		5						
Larve dittero da gabbiano		2						
Terriccio		1						

* Ri=Rieti, Al=Albano, CP=Castel Porziano, Mt=Macchiatonda, TF =Torre Flavia, Tc=Tor Caldara, Br=Bracciano.

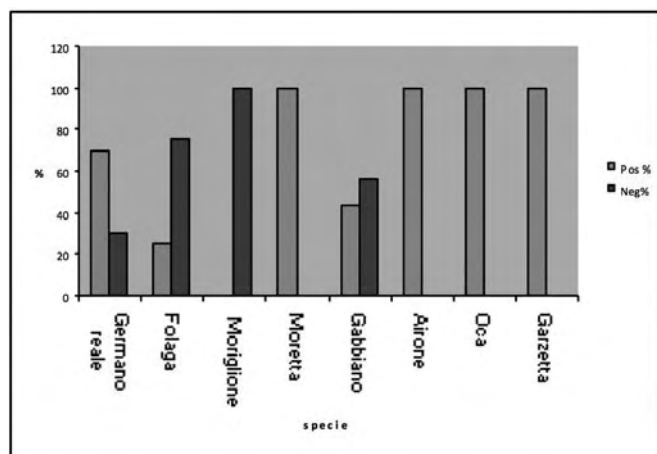
RISULTATI

I risultati ottenuti sono riportati in Tabella. 2 e Grafico.1; in tutti i campioni positivi è stata riscontrata la presenza di tossina botulinica tipo C. Per quanto concerne i parametri chimico fisici dell'acqua superficiale, rilevati durante i sopralluoghi sul lago di Albano e sui laghi Lungo e Ripasottile, questi erano: pH 8,5, temperatura 22-24°C, ossigeno disciolto 0,2-0,7ppm. In tutte le aree interessate da focolai, con l'eccezione di Castel Porziano e Bracciano, è stata riportata anche la contemporanea presenza di pesci morti. Nei periodi in cui si sono verificati i focolai, il lago di Albano era inoltre interessato da un evidente abbassamento del livello dell'acqua.

Tabella.2 – Risultati della ricerca di tossina botulinica tipo C in uccelli ed altre matrici provenienti dai focolai

Specie/Matrice	Totale	Positivi
Germano reale	10	7
Folaga	4	1
Moriglione	1	0
Moretta	3	3
Gabbiano	57	25
Airone	1	1
Oca	1	1
Garzetta	1	1
<i>Lucilia</i> sp. (larve)	5	4
<i>Sarcophaga</i> sp. (larve)	2	2
<i>Musca</i> sp. (larve)	1	1
<i>Fannia</i> sp. (larve)	5	4
Larve dittero da gabbiano	2	2
Terriccio	1	1

Grafico.1 – Distribuzione percentuale della tossina botulinica tipo C negli esemplari delle diverse specie di uccelli rinvenute nei focolai



DISCUSSIONE

Il verificarsi di epidemie ricorrenti negli ultimi anni, unitamente ai risultati del presente lavoro, sembrano indicare che in Italia centrale si siano ormai instaurate condizioni climatiche favorevoli allo sviluppo della tossina botulinica nei mesi più caldi dell'anno, in aree umide con caratteristiche ambientali idonee. In particolare sembra che condizioni di siccità, innalzamento del pH dell'acqua e la diminuzione dell'ossigeno disciolto, favoriscano l'insorgenza di epidemie. La mancanza di dati relativi all'entità numerica delle popolazioni delle diverse specie aviarie coinvolte non ha, al momento, consentito un'indagine sull'eventuale impatto del botulismo sulle medesime popolazioni.

Nei focolai in cui sono stati coinvolti solo i gabbiani è risultato difficile definire l'epicentro del focolaio stesso; è noto, infatti, che questi uccelli compiono giornalmente spostamenti, anche su distanze notevoli. Pertanto, non si può escludere che abbiano contratto il botulismo in zone diverse da quelle ove siano poi stati rinvenuti morti.

Interessante appare il riscontro della tossina botulinica anche in larve di diversi generi di ditteri saprofagi: i risultati ottenuti permettono, infatti, di confermare il loro ruolo come veicolo della tossina per via alimentare dalle carcasse su cui si nutrono ad esemplari di avifauna che le utilizzino come fonte alimentare (3).

Allo scopo di definire meglio alcuni aspetti dell'epidemiologia del botulismo aviario (aree a rischio, fattori ambientali determinanti, specie aviarie più sensibili, eventuale coinvolgimento di specie ittiche, rischi per la salute umana, ecc.), l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana è coinvolto in uno specifico progetto di ricerca corrente finanziato dal Ministero della Salute nell'annualità 2010.

BIBLIOGRAFIA

1. Botulism in the United States, 1899-1996. Handbook for epidemiologists, clinicians and laboratory workers. CDC 1998, 15 - 21.
2. De Medici, D., Anniballi, F., Wyatt, G. M., Lindstrom, M., Messelhauser, U., Aldus, C. F., Delibato, E., Korkeala, H., Peck, M. W., Fenicia, L. (2009). Multiplex PCR for Detection of Botulinum Neurotoxin-Producing Clostridia in Clinical, Food, and Environmental Samples. Appl. Environ. Microbiol. 75: 6457-6461
3. Hubalek, Z. & Halouzka J. (1991). Persistence of *Clostridium botulinum* type C toxin in blow fly (Calliphoridae) larvae as a possible cause of avian botulism in spring. J. Wild. Dis. 27 (1): 81-85.

SALMONELLA TYPHIMURIUM IN UN EPISODIO DI MORTALITÀ IN VERDONI (CARDUELIS CHLORIS) A VITA LIBERA

Bregoli M. ¹, Di Giusto T. ¹, Deotto S. ¹, Longo A. ², Squecco G. ³, Cocchi M. ¹, Barco L. ²

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – SCT4 Udine; ² Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – CRN Salmonellosi Legnaro (PD), ³ASS3 Azienda Sanitaria Alto Friuli

Key words: S. Typhimurium; passeriformi; mortalità

ABSTRACT – *Salmonella* Typhimurium is considered an important wild bird pathogen. An outbreak of mortality of passerines was recorded in Friuli Venezia Giulia Region during the spring 2010. *S. Typhimurium* was isolated from free living greenfinches (*Carduelis chloris*) representing, to the authors' knowledge, the first report of *S. Typhimurium* related mortality in free living garden birds in Italy.

INTRODUZIONE

Il monitoraggio degli episodi di mortalità anomala costituisce un importante elemento nell'ambito della sorveglianza sanitaria della fauna selvatica a vita libera. La diffusione di diversi sierotipi di *Salmonella* viene segnalata in ambito selvatico in numerose specie, che rivestono differente ruolo epidemiologico: sono indicatori la volpe (*Vulpes vulpes*), il tasso (*Meles mes*) e il cinghiale (*Sus scrofa*), è serbatoio per quanto riguarda *S. Typhimurium* il riccio (*Erinaceus europaeus*) (5), oppure ospiti a fondo cieco, come nel caso di *S. Dublin* nel camoscio (*Rupicapra rupicapra*) (3) e vittime di episodi di mortalità, ma anche fonte di spill-over, come evidenziato nell'avifauna. In particolare, *S. enterica* subsp. *enterica* sierotipo Typhimurium è stata descritta come una delle più frequenti cause di mortalità nei passeriformi (*Fringilla coelebs*, *Carduelis carduelis*, *Carduelis chloris*, *Passer domesticus*, *Passer montanus*) soprattutto in Nord Europa e Nord America (4, 7, 9). Generalmente i soggetti colpiti si trovano in cattivo stato di nutrizione e possono presentare processi infiammatori di tipo necrotico e fibrinopurulento a carico di esofago, ingluvie, fegato e milza e polisierositi (4).

MATERIALI E METODI

Nell'ambito di un episodio di mortalità anomala in verdoni (*Carduelis chloris*), che ha interessato alcune decine di esemplari nel comune di Resiutta (UD) nel mese di aprile 2010, sono stati conferiti due soggetti presso la sezione di Udine dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie per l'esame necroscopico. I soggetti sono stati sottoposti ad esame anatomopatologico, esame batteriologico e ricerca di virus, in particolare influenza aviaria e Flaviviridae (West Nile e Usutu). Gli isolati di *Salmonella* sono stati sierotipizzati secondo lo schema di Kauffman-White (8) tramite agglutinazione su vetrino, quindi è stata eseguita la tipizzazione fagica sulla base del protocollo suggerito da Anderson (1) e seguendo lo schema interpretativo dell'International Federation for Enteric Phage Typing (IFEPT, Laboratory of Enteric Pathogens, Health Protection Agency, Colindale, London, United Kingdom). Infine, è stato determinato il profilo di antibiotico resistenza secondo il metodo Kirby-Bauer testando le seguenti molecole: colistina, sulfametossazolo + trimetoprim, kanamicina, gentamicina, ceftazidime, cefotaxime, amoxicillina + acido clavulanico, acido nalidixico, tetraciclina, ampicillina, streptomina, sulfonamidi, cloramfenicolo, cefalotina, enrofloxacin e ciprofloxacina.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nei soggetti esaminati è stata rilevata la presenza di aerosacculite e polisierosite fibrinopurulenta con epatomegalia. Le ricerche virologiche sono risultate negative per i virus influenzali aviari, West Nile e Usutu.

L'esame batteriologico dei sacchi aerei ha evidenziato colonie riferibili a *Salmonella* in entrambi i soggetti. Gli isolati ottenuti sono stati inviati al Centro di Referenza Nazionale per la sierotipizzazione.

I due isolati di *Salmonella* provenienti dagli esemplari di verdone sono risultati appartenere al sierotipo Typhimurium. Alla fagotipizzazione entrambi gli isolati hanno presentato un profilo di lisi non corrispondente ad alcuno dei pattern contemplati nello schema interpretativo e pertanto sono stati classificati come RDNC (lettura stabile non identificata). Da sottolineare comunque che i profili di lisi dei due isolati erano identici. Infine, entrambi gli isolati sono risultati resistenti esclusivamente ai sulfamidici.

Il risultato della fagotipizzazione potrebbe essere legato alla diffusione e adattamento all'ospite di ceppi specifici e non comuni come ipotizzato da alcuni autori (6). Nel Regno Unito sono stati riscontrati nei passeriformi ceppi predominanti di *S. Typhimurium* responsabili di malattia sistemica e mortalità. Il fattore di rischio principale risulta essere comunemente rappresentato dai siti di alimentazione artificiale, postazioni in grado di determinare le maggiori concentrazioni microbiche in spazi limitati nei quali possono interagire diverse specie e in gran numero. Anche nel caso da noi descritto tale ipotesi potrebbe essere stata alla base della problematica, sebbene non possiamo escludere una contaminazione dell'alimento somministrato. Viene inoltre ipotizzato che i ceppi diffusi nei passeriformi si siano evoluti sviluppando una resistenza ambientale che ne favorisce la trasmissione e per questo motivo non abbiano ridotto la loro virulenza (7).

La diffusione di *Salmonella* in uccelli e roditori è considerata una possibile fonte di contaminazione fecale degli alimenti destinati al bestiame domestico e della trasmissione dell'infezione (5).

Alcuni autori evidenziano come infezioni da *S. Typhimurium* in diverse specie animali riflettano la frequenza d'infezione nell'avifauna e la frequenza di esposizione alla contaminazione ambientale correlata (2).

Sebbene i ceppi isolati nei passeriformi rappresentino un potenziale rischio zoonotico, generalmente non si rendono responsabili di episodi di trasmissione all'uomo (6). Tuttavia, in paesi come quelli scandinavi, dove le principali fonti di trasmissione di salmonella sono state notevolmente ridotte o, in alcuni casi eliminate, anche fonti minori, come quelle rappresentate dai passeriformi, tendono rivestire una certa importanza nell'epidemiologia del patogeno (10).

L'episodio descritto è stato registrato nel mese di aprile, in accordo con i pattern stagionali segnalati da altri autori che hanno evidenziato in particolare picchi di mortalità nei mesi di gennaio e aprile (4).

A conoscenza degli autori non vi sono precedenti segnalazioni di mortalità da *S. Typhimurium* in verdoni o altri passeriformi a vita libera in Italia.

BIBLIOGRAFIA

1. Anderson ES, Ward LR, Saxe MJ, and de Sa JD. 1977 "Bacteriophagetyping designations of *Salmonella* Typhimurium", *J Hyg*;78: 297-300
2. Duff, P.J., Holmes, J.P. & Papadopoulou, C. 2008, "Suspected spill-over infection with garden bird associated salmonellae to other species", *Book of Abstracts of the 8th Conference of EWDA*, pp. 32.
3. Glawischnig, W., Khashabi, D., Schopf, K., 2000. *Salmonella Enterica* serovar *Dublin* infection in Free living Chamois (*Rupicapra Rupicapra*). 4th Meeting of the European Wildlife Disease Association , pp. 31.
4. Hall, A.J. & Saito, E.K. 2008, "Avian wildlife mortality events due to salmonellosis in the United States, 1985-2004", *Journal of wildlife diseases*, vol. 44, no. 3, pp. 585-593.
5. Handeland, K., Refsum, T., Johansen, B.S., Holstad, G., Knutsen, G., Solberg, I., Schulze, J. & Kapperud, G. 2002, "Prevalence of *Salmonella* typhimurium infection in Norwegian hedgehog populations associated with two human disease outbreaks", *Epidemiology and infection*, vol. 128, no. 3, pp. 523-527.
6. Hughes, L.A., Shopland, S., Wigley, P., Bradon, H., Leatherbarrow, A.H., Williams, N.J., Bennett, M., de Pinna, E., Lawson, B., Cunningham, A.A. & Chantrey, J. 2008, "Characterisation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from wild birds in northern England from 2005 - 2006", *BMC veterinary research*, vol. 4, pp. 4
7. Hughes, L.A., Wigley, P., Bennett, M., Chantrey, J. & Williams, N. 2010, "Multi-locus sequence typing of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from wild birds in northern England suggests host-adapted strain", *Letters in applied microbiology*, vol. 51, no. 4, pp. 477-479.
8. Popoff M.Y. 2007 "Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars", In WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. 9th edn. Paris, Institut Pasteur.
9. Refsum, T., Heir, E., Kapperud, G., Vardund, T. & Holstad, G. 2002, "Molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar typhimurium isolates determined by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of isolates from avian wildlife, domestic animals, and the environment in Norway", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, no. 11, pp. 5600-5606
10. Wahlstrom, H., Andersson, Y., Plym-Forshell, L. & Pires, S.M. 2011, "Source attribution of human *Salmonella* cases in Sweden", *Epidemiology and infection*, vol. 139, no. 8, pp. 1246-1253.

CONFRONTO DI DUE REAL TIME PCR PER LA DIAGNOSI DELLA MALATTIA DI AUJESZKY

Bresaola M., Canelli E., Catella A., Lelli D., Sozzi E., Cordioli P.

IZSLER, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

Keywords: malattia di Aujeszky, Real time PCR

SUMMARY

The successful eradication of Aujeszky disease depends on the rapid detection of the causative agent (Swine Herpesvirus-1) in infected animals.

In this study, two Real Time PCR assays [3, 4], both based on TaqMan chemistry, were evaluated for their capability to detect gB and gE genes of SHV-1 into nervous tissues (trigeminal ganglion, olfactory bulb and brain stem) and tonsils. The obtained results suggest that the analytic sensitivity of the two assays was approximately identical and for both, gE sensitivity is lower than the gB one.

INTRODUZIONE

La malattia di Aujeszky è una patologia infettiva contagiosa sostenuta da Swine Herpesvirus-1 (SHV-1). Nel suino la malattia dà origine a quadri clinici differenti, quali encefalite acuta nei giovani, sindrome respiratoria negli adulti ed ipofertilità e aborto nei riproduttori.

La vaccinazione dei suini per SHV-1 è considerata la principale strategia di controllo della malattia ed uno strumento indispensabile per giungere all'eradicazione [1]. Inoltre l'utilizzo di vaccini marker (gE-deleti) rende la vaccinazione ancora più efficiente permettendo mediante test ELISA, di differenziare gli animali vaccinati da quelli infetti.

Come gli alphaherpesvirus umani, anche SHV-1 è in grado di infettare il tessuto nervoso dell'ospite naturale e di sopravvivere in questo per lungo tempo in forma latente. La riattivazione del virus latente può avvenire in concomitanza ad eventi stressogeni naturali e il suino sieronegativo torna ad essere una possibile fonte di contagio all'interno dell'allevamento.

Lo scopo del presente lavoro è quello di confrontare le performance analitiche di due Real Time PCR descritte in letteratura e utilizzate per la rilevazione di DNA genomico di SHV-1 (gB e gE) in diversi organi di suino.

MATERIALE A METODI

Campioni

Stock virali. Per la valutazione della sensibilità analitica delle due Real Time PCR sono state impiegate diluizioni in base 10 di due stock di SHV-1: il ceppo 252504 (titolo $10^{-7.6}$ TCID₅₀/50µl) isolato nel 2006 e il ceppo 54/84 (titolo $10^{-6.4}$ TCID₅₀/50µl) utilizzato come ceppo di riferimento dai laboratori dell'IZSLER per la valutazione dell'efficacia della vaccinazione e la produzione di anticorpi monoclonali. Considerando il titolo dei due stock virali, sono state utilizzate diluizioni comprese tra 10^{-4} e 10^{-8} .

Materiali patologici positivi. Sono stati esaminati tonsille ed encefali di suini, di età compresa tra i cinquanta e i sessanta giorni, infettati sperimentalmente presso le stalle di isolamento dell'IZSLER per la produzione di sieri di riferimento. Per l'infezione sono stati utilizzati il ceppo ADV 75V19 (titolo $10^{-6.6}$ TCID₅₀/50µl) e il ceppo vaccinale Bucarest (titolo $10^{-6.5}$ TCID₅₀/50µl). Gli animali sono stati successivamente sacrificati a 5, 8, 11, 19 e 20 giorni post-infezione. Le tonsille dei suini sacrificati 5 giorni dopo l'infezione sono risultate positive per

SHV-1 in immunofluorescenza, quelle del suino abbattuto 8 giorni post infezione debolmente positive e negative le tonsille degli altri animali. Dall'ottavo giorno post infezione gli animali hanno sierconvertito sia per gB che per gE.

Infine sono stati utilizzati tre encefali, due di cane ed uno di bovino, ed un polmone di suino, conferiti alla sezione diagnostica dell'IZSLER e risultati positivi per SHV-1 all'isolamento virale in tessutocoltura.

Estrazione e purificazione del DNA genomico

Il DNA genomico è stato estratto dalle diverse matrici utilizzando il kit Qiagen Mini Elute™ secondo le indicazioni del produttore. Il DNA è stato successivamente eluito in 40 µl di H₂O nucleaset-free e conservato a -70°C fino all'utilizzo.

Real Time PCR

Sono stati impiegati due differenti protocolli di Real Time PCR, come descritto da Yoon *et al*, 2005 (a) [4] e Ma *et al*, 2008 (b) [3]. Entrambi prevedono due reazioni di Real Time PCR, una per la ricerca di gB e una per la ricerca di gE. I due protocolli sono stati messi a punto al fine di rilevare la presenza di SHV-1 in differenti matrici (tessuto nervoso, tonsille, tamponi nasali), mediante la ricerca del genoma codificante per gB e di distinguere i ceppi di campo da quelli vaccinali, utilizzando primer specifici per gE. Di seguito vengono riportate in dettaglio le caratteristiche di reazione dei due protocolli di Real Time PCR. Per tutte le reazioni la soglia di positività è stata fissata a 38 Ct (reazione positiva per Ct ≤ 38; negativa per Ct > 38).

Real Time PCR Yoon et al, 2005 (a)

Per entrambe le reazioni:

Mix di reazione: 5 µl di DNA genomico, 12.5 µl di 2x TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystem), 2.5 µl per ciascun primer alla concentrazione finale di 900 nM e 2.5 µl di sonda (marcata 5'-FAM e 3'-TAMRA) alla concentrazione di 250 nM.

Profilo termico: 95°C per 10 minuti, 50 cicli di 94°C per 1 minuto, 60°C per 30 secondi, 72°C per 1 minuto.

Primer e sonde specifici per gB e gE:

gB forward 5'-ACGGCACGGGCGTGATC-3'
gB reverse 5'-ACTCGCGGTCCTCCAGCA-3'
gB probe 5'-CTCGCGCGACCTCATCGAGCCCTGCAC-3'

gE forward 5'-TCGTGATGACGTGCGTCGTCG-3'
gE reverse 5'-CGCGGAACAGTCGTCGAAGC-3'
gE probe 5'-CTACGAGGGGCCGTACGCGAGCCTGGA-3'

Real Time PCR Ma et al, 2008 (b)

Per entrambe le reazioni:

Mix di reazione: 2.5 µl di DNA genomico, 12.5 µl di 2x TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystem), 0.5 µl per ciascun primer alla concentrazione finale di 20 µM e 0.2 µl di sonda (marcata 5' FAM e 3'-TAMRA), alla concentrazione finale di 25 µM.

Profilo termico: 95°C per 10 minuti, 40 cicli di 94°C per 15 secondi e 62°C per 1 minuto.

Primer e sonde specifici per gB e gE :

gB forward 5'-ACAAGTTCAAGGCCACATCTAC -3'
gB reverse 5'-GTCYGTGAAGCGGTTTCGTGAT -3'
gB probe 5'-ACGTCATCGTCACGACC -3'

gE forward 5'-CTTCCACTCGCAGCTCTTCTC -3'
gE reverse 5'-GTRAAGTTCTCGCGGGAGT -3'
gE probe 5'-TTCGACCTGATGCCGC -3'

Analisi statistica

Al fine di valutare la concordanza tra i risultati delle due PCR, è stato calcolato il coefficiente kappa di Cohen (k). La scelta di questa statistica si è basata sul fatto che non esiste un gold standard da utilizzare nell'analisi. L'interpretazione del coefficiente è quella descritta da Landis et al. (1977) secondo i seguenti range: $k < 0.00$ concordanza "scarsa", $0 < k < 0.02$ "lieve", $0.21 < k < 0.40$ "discreta", $0.41 < k < 0.60$ "moderata", $0.61 < k < 0.80$ "sostanziale", e $0.81 < k < 1.00$ "eccellente" [2].

RISULTATI E DISCUSSIONE

I due protocolli di Real Time PCR hanno mostrato analoga sensibilità analitica per gB ($k=1$) quando sono state analizzate le diluizioni dei due stock virali (Tab. 1). Per entrambe le PCR per gB, la soglia di rilevamento è stata la diluizione 10^{-7} , che coincide col titolo ottenuto in tessutocoltura e calcolato secondo la formula di Reed-Muench. Tale dato discorda con quanto riportato da Ma et al., 2008 [3], che descrive una sensibilità maggiore di due diluizioni per la Real Time PCR.

Considerando le singole reazioni per gE, la Real Time PCR (b) è risultata più sensibile rispetto alla (a), in quanto la prima ha dato esito positivo nel 60% dei campioni (fino alla diluizione 10^{-6}), al confronto di un 40% (fino a 10^{-5}) della seconda. La concordanza calcolata per le due reazioni è comunque risultata "sostanziale" ($k=0.62$). Inoltre entrambe le reazioni per gE si sono dimostrate meno sensibili rispetto a quelle per il rilevamento di gB (Tab.1). Questo dato potrebbe essere associato anche al fatto che il gene gE è meno conservato rispetto il gene gB.

Tab. 1: Risultati (espressi come Ct) delle Real Time PCR utilizzate sulle diluizioni degli stock virali.

Stock virale e diluizione	gB		gE	
	(a)	(b)	(a)	(b)
252504 10^{-4}	26,3	28,1	29,3	29,7
252504 10^{-5}	29,7	31,8	33,4	33,9
252504 10^{-6}	33,7	35,2	-	37,2
252504 10^{-7}	36,4	37,1	-	-
252504 10^{-8}	-	-	-	-
54/84 10^{-4}	25,4	27,5	29,7	29,1
54/84 10^{-5}	28,2	30,3	32,3	33,3
54/84 10^{-6}	31,1	34,8	-	37,5
54/84 10^{-7}	37,4	37,5	-	-
54/84 10^{-8}	-	-	-	-

Le Real Time PCR eseguite sui campioni ottenuti dall'infezione sperimentale (Tab. 2) hanno fornito risultati analoghi tra loro sia per gB che per gE ($K=1$). In particolare, tutte le tonsille sono risultate positive sia per gB che per gE. Al contrario, gli encefali sono risultati positivi per gB, ma negativi per gE. Questo potrebbe essere dovuto ad una minore sensibilità delle due PCR per gE e/o ad una ridotta quantità di genoma di SHV-1 rilevabile a livello di SNC.

Tab. 2: Risultati (espressi come Ct) delle Real Time PCR su campioni ottenuti da infezione sperimentale.

N. suino	gB		gE	
	(a)	(b)	(a)	(b)
	Tonsille		Tonsille	
1264 (5g p.i.)	32,8	27,8	30,0	29,8
1295 (5g p.i.)	28,2	25,1	30,0	27,7
1265 (8g p.i.)	31,6	30,2	34,5	32,1
1298 (11g p.i.)	33,8	33,9	34,6	36,5
1230 (11g p.i.)	28,9	28,4	30,4	30,4
1260 (19g p.i.)	29,3	28,8	30,1	31,2
1227 (19g p.i.)	29,8	28,9	29,1	30,5
1718 (5g p.i.)	26,2	24,4	27,7	25,9
122 (5g p.i.)	23,0	21,9	26,0	24,1
	SNC		SNC	
1264 (5g p.i.)	33,6	34,8	-	-
1295 (5g p.i.)	35,1	37,8	-	-
1265 (8g p.i.)	35,1	35,7	-	-
1228 (8g p.i.)	36,9	37,6	-	-

Infine per quanto riguarda i materiali patologici i risultati ottenuti sono stati differenti: i due encefali di cane sono risultati positivi per gB e gE sia con il protocollo (a) che con il (b) mentre l'encefalo di bovino e il polmone di suino sono risultati positivi per gE con entrambe le PCR, ma positivi per gB solo con il protocollo (a) (Tab. 3). Questo dato deve essere ulteriormente analizzato per verificare se esistono mutazioni nella porzione del genoma che codifica per la gB di questi ceppi che non permettono l'amplificazione con i primer utilizzati nella real Time PCR b.

Tab. 3: Risultati (espressi come Ct) delle Real Time PCR su materiali patologici.

Specie	gB		PCR gE	
	(a)	(b)	(a)	(b)
Cane SNC	26,2	28,4	29,7	27,6
Cane SNC	30,5	31,9	33,8	33,1
Bovino SNC	29,6	-	34,4	31,3
Suino polmone	16,1	-	19,3	18,9

Per questo motivo e in base ai risultati ottenuti sono in corso ulteriori studi per verificare la sensibilità e specificità diagnostica dei due protocolli. In particolare deve essere meglio indagata l'efficienza delle Real Time PCR su campioni di tessuto nervoso, dove la quantità di genoma virale è minore e inferiore potrebbe essere anche l'efficienza dell'estrazione dell'acido nucleico.

Ringraziamenti: Lavoro finanziato dal Ministero della Salute PRC2007009

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- [1] Fonseca A.A. et al, Molecular epidemiology of Brazilian pseudorabies viral isolates. (2009) *Veterinary Microbiology* **141**:238-245.
- [2] Landis, J. R. and G. G. Koch. The measurement of observer agreement for categorical data. (1977) *Biometrics*, **33**: 159-174.
- [3] Ma W. et al, Development of Real Time Polymerase chain reaction for rapid detection and differentiation of wild-type pseudorabies and gene-deleted vaccine virus. (2008) *J Vet Diagn Invest* **20**:440-44.
- [4] Yoon H.A. et al, Molecular survey of latent pseudorabies virus infection in nervous tissues of slaughtered pigs by nested and Real-time PCR. (2005) *The Journal of Microbiology* **10**:430-436.

STIMA DELLA POPOLAZIONE DEI CANI DI PROPRIETÀ RESIDENTI NEI MUNICIPI DI COMPETENZA DELLA ASL ROMA B

Caminiti A., Meoli R., Sala M., Alfonsi P.⁽¹⁾, Rombolà P., Battisti S., Eleni C., Spallucci V., Scaramozzino P.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

⁽¹⁾ ASL Roma B – Area Veterinaria, Igiene degli Allevamenti e delle Produzioni Zootecniche

Key words: stima della popolazione canina, anagrafe canina, metodo della cattura e ricattura

ABSTRACT

In Italy, according to the Framework Law n.281/1991 on stray dog population control, dog owners are responsible for the registration of the dog in the National Dog Register. Over recent years, this provision was further enforced by Ministerial Decisions in 2008 and then in 2010. In the Latium Region, an information system for dog registration (Anagrafe Canina Informatizzata della Regione Lazio – ACIRL) has been running for several years. It was developed and put in place specifically to collect, store and manage records of dogs and owners as well. The objective of this study was to estimate the dog population size living in metropolitan area of Rome under the jurisdiction of the Local Health Unit ASL Roma B. Indirectly, it was also aimed to the evaluation of the completeness and reliability of the ACIRL. For this purpose, the classic method of "Capture-mark-recapture" was applied combining two sets of data: the former was extracted from the central database of the ACIRL and the latter was obtained through the submission of a face-to-face questionnaire to citizens waiting in the sitting room of five points of access for booking and payment of specialist care (Centri Unici di Prenotazione). After the preliminary analysis, the overall size of the population under investigation was 22.806 dogs (21.467-24.145, IC 95%). According to this value, the proportion of dogs registered with the ACIRL was about 75% of the total dog population.

INTRODUZIONE

L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana è attualmente impegnato in un progetto di ricerca sull'incidenza dei tumori nei cani residenti nei quattro municipi di competenza della ASL Roma B (Mappa 1).

Mappa 1. Area metropolitana di Roma suddivisa per municipio. In evidenza, i quattro municipi di competenza della ASL Roma B (municipi V, VII, VIII e X)



Requisito essenziale per il calcolo dell'incidenza cumulativa sia totale che specifica, cioè quella relativa alla singola forma di tumore, è la determinazione del denominatore, ossia dell'intera popolazione dei cani a rischio. E' nota la difficoltà di ottenere stime realistiche e attendibili delle popolazioni di animali. Lo scopo principale del presente lavoro è stato quello di stimare la dimensione della popolazione canina residente nei quattro municipi metropolitani di interesse, con una precisione predefinita e ritenuta accettabile per il successivo calcolo delle misure di frequenza dei tumori.

MATERIALI E METODI

E' stato utilizzato il metodo classico della "Cattura e ricattura" secondo Lincoln-Petersen. Nella sua forma più semplice, esso prevede il campionamento casuale della popolazione attraverso due sessioni di cattura che devono avvenire in successione. Con la prima cattura è raccolto un campione di individui opportunamente marcati, cioè resi riconoscibili a distanza di tempo mediante una caratteristica identificativa univoca, quale un carattere fisico distintivo, un anello di riconoscimento o una codifica formale. Una volta marcati, gli individui sono rilasciati nella popolazione di origine. Con la successiva cattura, è raccolto un secondo campione di individui, alcuni dei quali risulteranno appartenere al primo campione perché riconoscibili dalla marcatura precedentemente applicata. Questi ultimi rappresentano i ricatturati. Quando gli assunti alla base del metodo sono rispettati e la dimensione campionaria è sufficientemente ampia, allora la seguente equazione fornisce una stima della popolazione totale priva di errori sistematici (1):

$$M / N = R / C \Rightarrow N = (M * C) / R$$

dove

N = popolazione totale incognita che si vuole stimare

M = catturati con il primo campione

C = numero totale di catturati con il secondo campione

R = numero di ricatturati con il secondo campione

Calcolo del valore M - prima cattura. Come prima cattura (M nella formula) è stato utilizzato l'elenco dei cani viventi e residenti nei 4 municipi, regolarmente iscritti presso l'Anagrafe Canina Informatizzata della Regione Lazio (ACIRL). Quindi, la caratteristica selezionata per marcare inequivocabilmente i cani alla prima cattura è stata la loro registrazione nell'ACIRL. In questo elenco, è stato necessario verificare la presenza di cani eventualmente già deceduti oppure trasferiti in un altro comune i quali, per qualche ragione, non fossero stati ancora cancellati: infatti, un margine di errore troppo alto in questa direzione avrebbe prodotto una sovrastima significativa dell'intera popolazione canina. A tal fine, è stato estratto dall'anagrafe canina un campione di numeri di telefono dei proprietari e sono state condotte delle interviste telefoniche per verificare se il cane fosse ancora in vita e/o il proprietario fosse tuttora residente nei suddetti municipi. Il campione minimo necessario a soddisfare il requisito di rappresentatività della popolazione canina iscritta nell'ACIRL è

risultato pari a 384 cani. Tale campione è stato calcolato ponendo una prevalenza attesa di cani deceduti ma ancora iscritti come viventi del 10% (assunto concordato con i responsabili dell'anagrafe canina presso l'ASL Roma B), un errore standard pari al 3% ed un livello di confidenza del 95%. Al fine di poter disporre degli eventuali rimpiazzi necessari al raggiungimento del campione minimo atteso di 384 cani e ipotizzando una percentuale di risposta alle interviste telefoniche pari al 70%, sono stati estratti mediante campionamento casuale semplice 544 numeri di telefono. Tutti i dati anagrafici dei proprietari sono stati omessi per garantire la riservatezza.

Calcolo del valore C e R – seconda cattura e ricatturati. La seconda cattura (C nella formula) è stata condotta in modo attivo attraverso la somministrazione diretta di un questionario alle persone presenti nelle sale d'aspetto di cinque Centri Unici di Prenotazione (CUP) distribuiti omogeneamente sul territorio dei quattro municipi. Il campione minimo necessario a soddisfare il requisito di rappresentatività dell'intera popolazione canina è risultato pari a 384 cani: tale campione è stato calcolato ponendo una prevalenza di cani non iscritti in anagrafe canina del 10% (assunto concordato con i responsabili dell'anagrafe canina presso l'ASL Roma B), un errore standard pari al 3% ed un livello di confidenza del 95%. Il questionario era composto da domande chiuse a risposta multipla: la prima domanda chiedeva se la persona intervistata fosse residente in uno dei municipi di competenza dell'ASL Roma B, mentre la seconda chiedeva se possedesse uno o più cani. In caso di risposta affermativa ad entrambe, i cani entravano a far parte della seconda cattura (C nella formula) e venivano raccolte informazioni accessorie quali l'età, il sesso, l'ambiente di vita e l'alimentazione (dati non utilizzati nel presente lavoro). L'ultima domanda era relativa all'eventuale iscrizione o meno del cane in anagrafe canina: quando l'intervistato confermava l'iscrizione, il cane andava ad alimentare anche il gruppo dei ricatturati (R nella formula).

RISULTATI

A marzo 2011, nei municipi di competenza dell'ASL Roma B risultavano iscritti in anagrafe canina 19.929 cani. Prima di essere utilizzato come prima cattura (M), questo valore è stato aggiustato attraverso le interviste telefoniche, le quali sono state realizzate da aprile e maggio 2011. Sono state condotte un totale di 793 telefonate (ogni numero poteva essere chiamato più volte) che hanno permesso la raccolta di informazioni su 405 cani: di questi, 45 sono risultati morti oppure residenti in comuni differenti dai municipi dell'ASL Roma B. I risultati dalle interviste telefoniche hanno restituito una percentuale di congruenza dei dati contenuti in anagrafe canina pari al 89% (86%-92%, IC 95%). Il valore inferiore dell'intervallo di confidenza (86%) è stato quindi utilizzato per aggiustare il numero dei cani viventi iscritti da 19.929 a una stima di 17.105 (M effettivamente utilizzato nella formula), in quanto si è preferito adottare un approccio conservativo.

Da ottobre 2010 a febbraio 2011, sono stati somministrati i questionari *face-to-face* alle persone in attesa presso i CUP, raccogliendo i dati su 392 cani (C utilizzato nella formula): di questi, 294 sono risultati iscritti in anagrafe canina, ovvero ricatturati (R utilizzato nella formula), e 98 sono invece risultati non iscritti.

Applicando la formula riportata nel paragrafo precedente, la stima della popolazione canina totale residente nei municipi di competenza dell'ASL Roma B è risultata pari a 22.806 cani (21.467-24.145, IC 95%). L'intervallo di confidenza è stato calcolato secondo la seguente formula (2):

$$IC\ 95\% = 22.806 \pm \sqrt{[M \times C \times (M - R) \times (C - R)] + R^3}$$

DISCUSSIONE

Il presente studio ha fornito risultati incoraggianti relativamente alla completezza e all'attendibilità dei dati presenti nell'ACIRL. Riguardo alla completezza dei dati, a fronte della stima di 22.806 cani residenti nei quattro municipi (iscritti + non iscritti), anche adottando un approccio conservativo per il quale i cani viventi e iscritti in anagrafe canina sono stati ridotti a 17.105, la proporzione dei cani iscritti sulla popolazione totale risulta essere superiore al 75%. Riguardo all'attendibilità dei dati, la quale è stata verificata attraverso le interviste telefoniche, l'89% delle telefonate che hanno ricevuto risposta hanno confermato i dati presenti nell'ACIRL. Questo risultato, già di per sé positivo, è ancor più significativo dal momento che le incongruenze riscontrate nell'11% dei casi rimanenti non sono da imputare a problemi nel flusso dei dati proveniente dalle diverse ASL e gestito dall'ACIRL, ma piuttosto al comportamento dei proprietari: infatti, la maggioranza dei 45 proprietari che alle interviste telefoniche avevano risposto che il loro cane non era più in vita o che avevano cambiato residenza hanno anche dichiarato di non aver comunicato all'ASL il decesso o il cambio di residenza del cane.

La decisione di condurre la seconda cattura attraverso la somministrazione di un questionario *face-to-face*, sicuramente più dispendioso in termini di tempo e risorse, nasce dalla necessità di porre una domanda sull'avvenuta iscrizione o meno del cane in anagrafe canina. Questa domanda è sensibile, in quanto l'iscrizione è un obbligo di legge a decorrere dal secondo mese di vita del cane (3). In queste circostanze, quando cioè è necessario porre delle domande che possono essere percepite come riservate, il questionario *face-to-face* è riconosciuto come l'approccio di elezione (4). La scelta dei CUP come luoghi dove somministrare il questionario è stata dettata da due ragioni, assicurare una copertura soddisfacente del territorio in studio e garantire un campionamento randomizzato fra i proprietari di cani residenti. Si ricorda che presso i CUP si effettua sia la prenotazione delle prestazioni specialistiche che il pagamento delle stesse: poiché la prenotazione è possibile anche a terzi e il paziente è generalmente presente al momento del pagamento, che avviene il giorno dell'erogazione del servizio, la rappresentatività della base campionaria appare garantita.

Alla luce dei risultati preliminari, si ritiene necessario procedere ad un'ulteriore analisi dei dati: infatti, gli effetti di alcune variabili (i.e. l'età del cane, il mancato inserimento nell'ACIRL di cani anziani già iscritti prima dell'informatizzazione etc.), potrebbero condurre ad una sottostima o una sovrastima della popolazione canina.

Progetto finanziato con i fondi del Ministero della Salute RC_IZSLT_04/08.

Si ringrazia LAit - Lazio Innovazione tecnologica per la fornitura dei dati dell'anagrafe canina.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Robson, D.S., Regier H.A. (1964). Sample size in Petersen mark-recapture experiments. Trans. Am. Fish. Soc. 93 (3) 215-226
2. Thompson, S.K., (2002). Sampling. Chapter 18, 233-244
3. Ordinanza ministeriale del 6 agosto 2008 e proroga con Ordinanza del 21 luglio 2010: Ordinanza contingibile ed urgente concernente misure per l'identificazione e la registrazione della popolazione canina
4. Holbrook, A., Green, M., Krosnick, J. (2003). Telephone versus face-to-face interviewing of national probability samples with long questionnaires: comparisons of respondent satisficing and social desirability response bias. Public Opin Q (2003) 67 (1) 79-125

ABORTI CORRELATI CON INFEZIONI BATTERICHE IN RUMINANTI DA REDDITO BACTERIAL RELATED ABORTION IN PRODUCTION RUMINANTS

Caracappa S., Marineo S., Vesco G., Torina A., Galluzzo P. e Guercio A.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri", Palermo

Keywords: abortion, bacterial agents of abortion, production animal

SUMMARY - Numerous pathogen microorganisms have been associated with infertility and abortions. Many of the bacterial causes of abortion are zoonotic. During the 2010 more than one hundred forty anatomo-pathological, bacteriological and molecular exams have been carried out on two hundreds sheep, goat and cattle foetuses. Pathogen bacteria were found in 2-10% of analysed samples. These results expand current knowledges on causative agent of abortion in Sicily and are useful as a good history is critical in helping to focus the diagnostic investigation.

INTRODUZIONE - Vari agenti patogeni quali batteri, virus, protozoa e miceti nel tempo sono stati associati ad infertilità e aborti nei ruminanti. Infezioni causate da questi patogeni hanno l'effetto di causare ingenti perdite economiche all'allevatore rendendo necessarie decise misure di prevenzione (2). *Campylobacter fetus subsp.*, *Brucella abortus*, *Histophilus somnus*, *Listeria monocytogens*, *Chlamydia abortus*, *Ureaplasma diversum* e *Mycoplasma spp* sono i principali patogeni implicati quale causa di infertilità nei bovini. Gli aborti possono anche essere causati da batteri che fanno parte della normale flora microbica o essere presenti nell'ambiente (1, 6). Questi agenti infettivi possono includere: *Arcanobacterium pyogenes*, *Bacillus spp.*, *Escherichia coli*, *Pasteurella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus spp.*, and *Streptococcus spp.*.

Nei piccoli ruminanti, sebbene molti organismi possono causare sporadiche e fatali infezioni nei feti, un piccolo gruppo ha particolari abilità a colonizzare i feti e a causare aborti tardivi. Più frequentemente, *Brucella melitensis* e *Chlamydia spp.* o meno frequentemente *Campylobacter fetus subsp.*, *Salmonella spp.*, *Coxiella burnetii*, *Listeria monocytogens* (3), *Yersinia pseudotuberculosis* o *enterocolitica* sono causa di alterazioni patologiche della sfera genitale. I batteri coinvolti negli aborti delle capre sono sovrapponibili a quelli delle pecore (3).

L'identificazione degli agenti abortigeni è d'aiuto per prevenire la diffusione di ceppi pericolosi nell'ambiente.

Molti batteri causa di aborto danno origine a malattie zoonotiche per cui un'accurata diagnosi è il punto cruciale per controllare la salute umana e animale. Occorre evidenziare che le infezioni materne durante la gravidanza non si riflettono necessariamente nello sviluppo fetale. Gli effetti sullo sviluppo fetale possono essere causati direttamente dall'agente infettivo e/o dalle sue tossine o indirettamente in caso di placentite.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di fornire un quadro sulla diffusione dei batteri abortigeni in bovini, ovini e caprini provenienti da allevamenti siciliani nel 2010.

MATERIALI E METODI – Campioni: Il materiale pervenuto nei nostri laboratori accompagnato da una scheda riassuntiva in cui veniva descritta l'anamnesi del caso, conservato in contenitori a tenuta ermetica, era costituito da aborti o da involucri placentari. La scheda anamnestica era sempre raccolta da un veterinario ufficiale o libero professionista e congiuntamente al materiale patologico venivano ad essere inoltrati presso i laboratori

dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale mantenendo sempre la catena del freddo (+4°C) dal momento del prelievo. Nel 2010 la ricerca dei diversi batteri abortigeni è stata condotta in: bovini, ovini e caprini. Sono stati raccolti diversi tipi di campioni prelevati in seguito ad aborto: 54 feti bovini, 78 ovini 39 caprini.

All'arrivo in laboratorio i campioni venivano processati, secondo le procedure in uso, in cappa a flusso laminare di III livello, e distribuito ai laboratori competenti. Per ogni conferimento pervenuto si analizzavano polmoni, encefalo, cuore, fegato, milza e stomaco. **Caratterizzazione molecolare:** il DNA è stato estratto da placenti, organi fetali, e tamponi mediante il kit Pure Link Genomic DNA mini kit (Invitrogen) secondo le indicazioni del produttore. Per la PCR sono stati utilizzati i primer: BB1 5'-catatcttcggggcgagtggtta-3' e BB2 5'-tctgagccgttgcttgagatyg-3' per amplificare la regione IS711, e M13uni 5'-agggtttccagtcacgacgtt-3' e M13rev 5'-gagcggataacaatttcacacagg-3' come controllo interno della PCR: Il DNA di *Brucella melitensis* ATCC 23456 è stata utilizzata come controllo positivo.

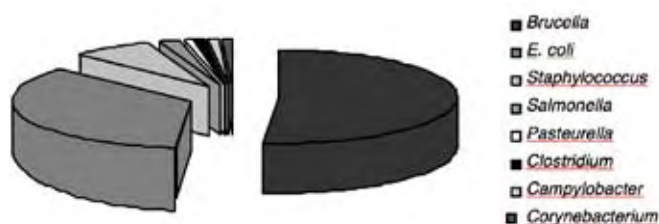
Isolamento dei ceppi e caratterizzazione biochimica: Dopo lo screening molecolare tutti gli organi sono stati utilizzati per la ricerca di tutti i patogeni causa di aborto (*Campylobacter spp.*, *Brucella spp.*, *Listeria monocytogens*, *Mycoplasma spp.*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium*, *Pasteurella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* and *Yersinia spp.*). Le analisi microbiologiche e la caratterizzazione sono state condotte in accordo con le procedure interne dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia.

RISULTATI – Dei 171 aborti esaminati sono risultati negativi 33 campioni ovini e n°34 campioni caprini. L'esito negativo sui campioni esaminati può essere attribuito a diversi fattori: campionamento non corretto, cause di tipo non infettivo come stress fisiologici, traumi, ecc..., oppure pannello di agenti abortigeni ricercati limitato solo ad alcuni patogeni. Quest'ultimo caso potrebbe fungere da stimolo per la messa a punto di metodiche diagnostiche più sensibili.

Tutti i risultati ottenuti sono schematizzati in fig 1 e in tab. 1.

Inoltre, a causa dell'elevato numero di ceppi di *Brucella spp.* isolati, i campioni destinati alla ricerca di *Brucella* sono stati sottoposti, prima dell'analisi microbiologica, all'esame molecolare mediante PCR: tutti gli esami microbiologici hanno confermato i risultati ottenuti con la PCR.

Fig.1 Percentuali dei batteri causa di aborto isolati in bovini, ovini e caprini nel 2010 in Sicilia.



Inoltre, la nostra analisi mostra una preferenza di *Escherichia coli* per i bovini (64.8.4% positivi) mentre *Brucella spp.* sembra avere una preferenza d'ospite per gli ovini (48.7% positivi).

Gli studi epidemiologici, con particolare attenzione per le preferenze per i vari ospiti, possono aiutare in una identificazione più rapida.

Tab.1 Batteri patogeni isolati da aborti provenienti da bovini, ovini e caprini.

Batteri isolati	Bovini (n°54)	Ovini (n°78)	Caprini (n°39)
<i>Brucella spp.</i>	29%	48.7%	0%
<i>Staphylococcus spp.</i>	7.4%	5.1%	0%
<i>Escherichia coli</i>	59.9%	0%	10.3%
<i>Salmonella spp.</i>	3.7%	0%	0%
<i>Clostridium spp.</i>	0%	1.3%	0%
<i>Corynebacterium spp.</i>	0%	1.3%	0%
<i>Campylobacter spp.</i>	0%	1.3%	0%
<i>Pasteurella spp.</i>	0%	0%	2.5%

DISCUSSIONI – Nel corso degli ultimi anni l'andamento epidemiologico della brucellosi in Italia è stato discontinuo con una diminuzione in alcune regioni ed una presenza costante in altre, come la Sicilia. Il picco è stato raggiunto nel 1997 quando il 59% dei casi segnalati riguardavano la sola Sicilia (5). Dai risultati ottenuti possiamo affermare che tra le cause di aborto tardivo negli allevamenti ovini del territorio siciliano, uno dei principali agenti presenti in maniera omogenea è la *Brucella melitensis biovar 3*. Per quanto riguarda gli allevamenti bovini la specie di *Brucella* più diffusa è la *B. abortus biovar 3*. A tal fine l'obiettivo degli allevatori e del personale veterinario deve essere quello di monitorare costantemente lo stato di salute degli animali e valutare la diffusione di ceppi di *Brucella spp.* per eliminare e prevenire la possibilità di reintroduzione di infezioni in allevamenti "ufficialmente indenni". La coordinazione tra l'analisi microbiologica e quella molecolare fornisce risultati rapidi e più precisi.

Da ricerche bibliografiche effettuate negli anni '90 risulta che in Sicilia il più diffuso agente abortigeno nelle pecore era *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Abortus ovis (4). Molto verosimilmente questo dato può essere correlato con le vaccinazioni di massa e le terapie antibiotiche mirate nei confronti degli agenti patogeni effettuate in quegli anni.

Si auspica, in un prossimo futuro, di effettuare controlli a tappeto all'interno di allevamenti problema affinché si possa avere, in tempi brevi, una diagnosi di certezza della malattia escludendo altri eventuali patogeni, agenti di infezione, sia per l'uomo che per la mandria.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Barr BC, Anderson ML, 1993, Infectious diseases causing bovine abortion and fetal loss, Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 9:343–68;
- 2) Givens MD, Marley MS, 2008, Infectious causes of embryonic and fetal mortality. Theriogenology, 70(3):270-85;
- 3) Mobini S, Heath AM, Pugh DG, 2002, Sheep and goat medicine, Theriogenology of sheep and goats, Pugh DG, editor, Philadelphia: W.B. Saunders Company, p. 129–86;
- 4) Nastasi A, Mammìna C, Villafrate MR, Caracappa S, Di Noto AM, Balbo R., 1991 - Epidemiological evaluation by rRNA-DNA hybridization of strains of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abortusovis isolated in southern Italy in the years 1981-1989, Bollettino Dell Istituto Sieroterapico Milanese, 70(1-2):475-81.
- 5) Picciotto D, Verso MG, Lacca G, Mangiapane N, Caracappa S, Vitale F, Vesco G., 1999 - The epidemiological trend of brucellosis in the provinces of Sicily, Medicina del lavoro, 90(6):786-90.
- 6) Yaeger MJ, Holler LD, 2007, Bacterial causes of bovine infertility and abortion, Youngquist RS, Threlfall WR, editors. Current therapy in large animal theriogenology, 2nd ed., St. Louis: Elsevier, p. 389–99.

RINGRAZIAMENTI - Si ringrazia il dott. F. Vitale per la consulenza di biologia molecolare e G. Rubino e D. Colletta per l'assistenza tecnica

INTOSSICAZIONE DA ENDOSULFAN IN UN ALLEVAMENTO DI BOVINI IN SICILIA

Caracappa S., Currò V., Vicari D., Vella A., Antoci F., Macaluso A., Iuculano G., Giangrosso G., Ferrantelli V.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri" Palermo;

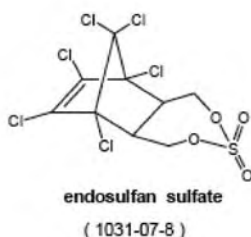
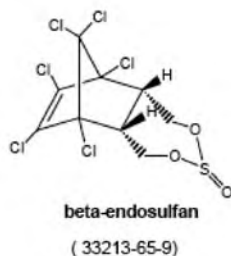
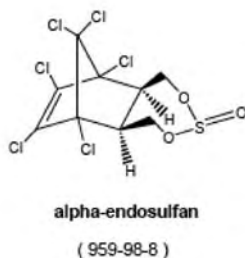
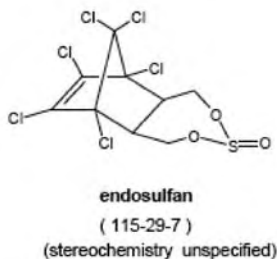
Key words: endosulfan, intossicazione, GC-ECD

ABSTRACT

Pesticides are largely utilized in agriculture to kill plants parasites. Sometimes animals can eat these substances through food (silage or other) and poisoning occurs. This study describes a case report about a poisoning by endosulfan in a Sicilian bovine farm. After the death of some animals with neurological signs, most infectious diseases were investigated. In the end some samples of feed were made to demonstrate toxic substances. The endosulfan was found in the stomach and in the kidney of the animals died and also in the feed.

INTRODUZIONE

L'endosulfan è un pesticida appartenente alla categoria degli organo clorurati largamente utilizzato a livello globale sin dal primo dopoguerra per trattamenti di colture ortofrutticole, vinicole, cerealicole, foraggiere, e per la preparazione di esche avvelenate per insetti del terreno. L'endosulfan appartiene alla categoria dei pesticidi organo clorurati altamente tossici con DL 50 < 50mg/Kg di peso corporeo per via orale. In commercio sono disponibili molteplici preparazioni contenenti endosulfan a varie concentrazioni (5). Gli organoclorurati sono composti organici con uno o più atomi di cloro, dotati di spiccata solubilità nei lipidi, lenta degradabilità e lunga persistenza nell'ambiente anche dell'ordine di anni ed è per questo motivo l'utilizzo di molte di queste molecole è stato bandito.



Il rischio tossicologico per gli animali può essere legato alla assunzione accidentale con l'acqua di bevanda o l'alimento o può essere di natura dolosa. Le vie di penetrazione del composto attivo nell'organismo sono quella inalatoria, attraverso l'apparato digerente, per contatto con le mucose e la cute.

Il meccanismo d'azione è basato sulla stimolazione aspecifica del sistema nervoso centrale con alterazione degli scambi ionici della membrana assonica che consiste nel ritardo della chiusura dei canali del sodio e inibizione della fuoriuscita del potassio. A tale meccanismo di azione segue una sintomatologia di tipo neurologico. Più frequentemente: irrequietezza, tremori muscolari, deambulazione incerta, scialorrea, meteorismo ruminale, respiro frequente e superficiale, midriasi.

Nel presente lavoro descriviamo un episodio di intossicazione da endosulfan che ha interessato un allevamento di bovine sito in una area particolarmente vocata all'allevamento di bovine da latte del territorio siciliano.

MATERIALI E METODI

L'allevamento di circa 100 capi di razza frisona comprendeva animali in lattazione, alcuni in asciutta, vitelli, giovenche.

Le bovine in lattazione ed i vitelli erano allevati a stabulazione fissa con una alimentazione differenziata per età e fase di produzione. Le bovine in asciutta erano allevate a stabulazione libera. Il proprietario riferiva che, nella settimana precedente, erano morte 4 bovine in produzione. Le stesse prima del decesso non riuscivano a mantenersi in posizione eretta.

Delle circa 30 lattifere in stalla, in 3 capi venivano registrati i seguenti sintomi: irrequietezza, tremori muscolari, deambulazione incerta, scialorrea, meteorismo ruminale, respiro frequente e superficiale, midriasi. Anche i risultati dell'esame anatomopatologico si allineano con quanto riportato in letteratura.

Al momento della visita in allevamento era presente 1 carcassa di un animale deceduto ed erano stati conservati a temperature di refrigerazione gli organi di una bovina deceduta il giorno prima (fegato, reni, intestino, cuore, polmoni, prestomaci ed emosiero). Il quadro anatomopatologico riscontrato in seguito ad una autopsia effettuata in loco: congestione poliviscerale, costipazione prestomacale, enterite muco catarrale, petecchie emorragiche a livello di epicardio. Lo stesso quadro anatomico patologico era presente in altre due bovine morte la settimana successiva. Sugli organi prelevati in sede autopsica si è condotta una indagine per la ricerca di agenti infettivi. Una volta formulato il sospetto di intossicazione, sulla base dei segni clinici e dell'esame anatomico patologico nonché sul riscontro negativo degli esami di laboratorio sugli organi prelevati in sede autopsica, ha trovato conferma nel rilievo di endosulfan nel mangime, nell'unifeed ed in tracce anche in alcuni organi.

Le analisi chimiche condotte nei laboratori dell'Area di Chimica e Tecnologie Alimentari dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia hanno previsto l'utilizzo della metodica per la determinazione di Pesticidi organoclorurati (Metossicloro, Aldrin, trans-Clordano, 2,4-DDT e 4,4-DDT, 4,4-DDE, 2,4-DDD

e 4,4-DDD, Dieldrin, α -Endosulfan, β -Endosulfan, Endosulfan solfato, Endrin, Eptacoloro, Esaclorobenzene, α -HCH, β -HCH, γ -HCH) in matrici biologiche mediante estrazione in fase solida ed analisi gas-cromatografica con rivelatore a cattura di elettroni ECD utilizzando due colonne di polarità diversa su due diversi canali.

La metodica utilizzata è la seguente: a 5gr di campione opportunamente omogeneizzato si aggiungono 100 μ L di fenclorfos come Standard Interno (SI) 50 mg/L e 50 ml di Acetonitrile (Sigma Aldrich). L'estrazione avviene in bagno ad ultrasuoni per circa 5 minuti a 30 °C, e quindi filtrare l'estratto attraverso carta da filtro in un matraccio tarato da 100ml; il lavaggio si effettua utilizzando più aliquote da 5 ml di acetonitrile. Portare successivamente a volume 100ml. Preparare una colonnina SPE C18 1000mg/6ml con in testa circa 2 cm di solfato di sodio anidro e collegarla al manifold da vuoto. Condizionare la colonna facendo eluire con 6 ml di acetonitrile senza mandare a secco ma lasciando un leggero battente di solvente e scartando l'acetonitrile raccolto. Caricare la colonnina C18 con 2 ml dell'estratto precedentemente. Eluire con 15 ml di acetonitrile, raccogliendo l'eluato in un pallone con collo a smeriglio da 50ml. Portare l'eluato raccolto a piccolo volume con evaporatore rotante, riprendere il residuo, trasferire in vials da 10ml e portare a secco in corrente di azoto alla temperatura di 40°C. Riprendere l'estratto ottenuto con acetone e portare al volume di 1 ml. La soluzione così ottenuta (concentrazione finale 0,1 g/ml di campione, 100 μ g/L di SI) è pronta per l'analisi in GC-ECD. Il modello di gascromatografo utilizzato è Gas-cromatografo Perkin-Elmer Clarus 500 con detector ECD. Le condizioni sperimentali hanno previsto l'utilizzo di due colonna cromatografiche:

- Canale A: VF-1701 capillare 30 m x 0,25 mm ID, 0.25 μ m film o equivalente;
- Canale B: VF-5 capillare 30 m x 0,25 mm ID, 0.25 μ m film o equivalente;

con le condizioni operative di seguito riportate:

- Carrier Gas: Azoto 5.5, flusso in colonna 2,0 ml/min.;
- Temperatura iniettore: 250 °C;
- Modalità di iniezione: Split;
- Flusso di splittaggio: 20 ml/min;
- Volume di iniezione: 1 μ L;
- Programma termico: 60 °C (isoterma per 0,5 minuti), rampa a 15 °C/min fino a 150 °C, rampa a 4 °C/min fino a 275 °C, rampa a 15 °C/min fino a 300 °C, (isoterma per 2 minuti).
- Temperatura degli ECD: 350 °C;
- Gas di Make-up: Azoto 5.5, flusso 30 ml/min;

RISULTATI

La ricerca di agenti biologici infettivi condotta sugli organi prelevati non ha dato esito positivo per agenti patogeni causa di malattie infettive. In campioni di unifeed, sfarinati e fieno negativi per micotossine (aflatossine, ocratossine, e zearalenone) si sono ricercati residui di sostanze nocive (organofosforici, esteri fosforici, piretroidi). Tali ricerche hanno dato esito negativo ad eccezione di α e β endosulfan a concentrazione rispettivamente di 0,3 mg/kg e 12,5 mg/kg nello sfarinato, 0,08 mg/kg e 0,2 mg/kg rispettivamente nell'unifeed e in tracce nel contenuto dello stomaco e nei reni prelevati nei tre bovini prelevati in occasione del 1° sopralluogo.

Tabella Riassuntiva		
UNIFEED	FIENO	SFARINATO
α Endosulfan 92 ppb	Negativo	α Endosulfan 292 ppb
β Endosulfan 223 ppb		β Endosulfan 1403 ppb
RENE 1	RENE 2	RENE 3
α Endosulfan tracce	α Endosulfan tracce	α Endosulfan tracce
β Endosulfan tracce	β Endosulfan tracce	β Endosulfan tracce
PRESTOMACO 1	PRESTOMACO 2	PRESTOMACO 3
α Endosulfan tracce	α Endosulfan tracce	α Endosulfan tracce
β Endosulfan tracce	β Endosulfan tracce	β Endosulfan tracce

DISCUSSIONE

Le indagini condotte con metodiche sia tossicologiche che anatomo-istopatologiche tendono a dimostrare come è possibile trovare corrispondenza tra i dati tossicologici e le alterazioni morfologiche degli organi bersaglio del principio attivo anche se molto spesso la corrispondenza sopra citata è vanificata dal riscontro di una concentrazione ampiamente al di sotto dei valori soglia di tossicità.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Andersson, P.L., Berg, A.H., Bjerselius, R., Norrgren, L., Olsen, H., Olsson, P.-E., Orn, S., Tysklind, M., 2001. Bioaccumulation of selected PCBs in zebrafish, three-spined stickleback and Arctic char three different routes of exposure. Archives of Environment Contamination and Toxicology 40, 519–530
- 2) Canadian Water Quality Guidelines (CWQG) for the protection of freshwater and marine aquatic life for the pesticide active ingredient endosulfan.
- 3) Chen, S., Lili, S., Zhengjun, S., Qiuhui, H., 2007. Determination of organochlorine pesticide residues in rice and human and fish fat by simplified two-dimensional gas chromatography. Food Chemistry 104, 1315–1319;
- 4) Conti M.B., Marchesi M.C., Leonardi L., Rueca F.: intossicazione da endosulfan in una mandria di bovine da latte: aspetti clinici Atti Convegno SISVet 2005
- 5) Kelch WJ, Kerr LA. Acute toxicosis in cattle sprayed with endosulfan. Vet Hum Toxicol. 1997 Feb;39(1):29-30.
- 6) Mor F, Ozmen O. Acute endosulfan poisoning in cattle. Vet Hum Toxicol. 2003 Dec;45(6):323-4.
- 7) Smith R.A. e Tramontin R.R. (1995) Cattle poisoning by a mixture of endosulfan, dieldrin, DDT and DDE Vet Hum Toxicol. 1995 Oct;37(5):470-1.
- 8) Stefanelli, P., Muccio, A.D., Ferrara, F., Barbini, D.A., Generali, T., Pelosi, P., Amendola, G., Vanni, F., Muccio, S.D., Ausili, A., 2004. Estimation of intake of organochlorine pesticides and chlorobiphenyls through edible fishes from the Italian Adriatic Sea during 1997. Food Control 15, 27–38.

IDENTIFICAZIONE DI ALIMENTI IRRADIATI A SCOPO CONSERVATIVO ATTRAVERSO L'USO DELLA SPETTROSCOPIA ESR

Cardamone C.⁽¹⁾, Di Noto A. M.⁽¹⁾, Palumbo P.⁽¹⁾, D'Oca M. C.⁽²⁾, Bartolotta A.⁽²⁾

⁽¹⁾ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri", Palermo

⁽²⁾ Facoltà di Farmacia, Dipartimento Farmacochimico, Tossicologico e Biologico, Università degli studi di Palermo, Palermo

Key words: irradiated food, ESR

Abstract

The Radiation Treatment is a safe e reliable method used for food and feed preservation. Among the Physical Identification Method, validated by European Committee of Standardization, the Spectroscopy ESR is suitable for vegetable food.

The aim of this work has been to value the use of ESR Spectrometer Bruker e-Scan "Food Analyzer" to identify irradiated food according to protocol EN 1786, 1787 e 13780.

Introduzione

Il trattamento a scopo conservativo degli alimenti tramite radiazioni ionizzanti prevede l'uso di dosi non superiori a 10 kGy. In particolare l'irraggiamento determina una riduzione della flora microbica contaminante, inibisce la germogliazione aumentando così il grado di conservazione e di sicurezza dell'alimento⁽¹⁾. In Italia tale trattamento è applicabile solo ad aglio, cipolla, patata e spezie, ma si ritiene che possano essere introdotti nel mercato alimenti irradiati, provenienti da Paesi in cui possono essere irradiate numerose tipologie di alimenti. Per tale ragione il D.L.vo n. 94 del 30.01.01, prescrive che tutti gli alimenti irradiati immessi sul mercato debbano riportare in etichetta la dicitura "irradiato" e che le autorità sanitarie debbano effettuare controlli sui prodotti in fase di commercializzazione. A tale scopo il Comitato Europeo di Normalizzazione ha emanato dei protocolli per l'utilizzo di metodi di identificazione di alimenti irradiati, distinti in metodi Fisici, Chimici e Biologici. Fra le tecniche di identificazione di tipo fisico, la Risonanza di Spin Elettronico (ESR) può essere applicata ad alimenti contenenti ossa (EN 1786)⁽²⁾, cellulosa (EN 1787⁽³⁾) e zuccheri (EN 13780)⁽⁴⁾, nei quali la radiazione produce radicali liberi stabili. Gli spettrometri ESR presenti fin ora in commercio, e utilizzati in molti laboratori di ricerca scientifica, sono risultati molto complessi, richiedono personale altamente specializzato per il loro utilizzo nonché dispendiosi per poter essere facilmente inseriti in laboratori di routine di controlli di qualità di alimenti.

Obiettivo di questo lavoro è stato quello di illustrare i risultati ottenuti presso l'Area di Microbiologia degli Alimenti utilizzando uno spettrometro ESR "e-scan Food Analyzer" dell'Azienda Bruker, le cui caratteristiche sono notevolmente differenti rispetto a quelle citate in precedenza, in quanto dotato di un software che gestisce le analisi in maniera rapida e specifica in funzione della matrice da analizzare e di conseguenza del radicale radioindotto da identificare.

Materiali e metodi

Le matrici alimentari analizzate variano in funzione del protocollo applicato; in particolare: campioni di ossa di pollo, tacchino, suino, ovino, bovino e lische di pesce per l'identificazione attraverso l'uso della spettroscopia ESR dei radicali radioindotti formati a carico della idrossiapatite secondo il protocollo EN 1786; campioni di pistacchio, noccioline, arachidi, per l'identificazione dei radicali formati a

carico della cellulosa secondo il protocollo EN 1787; campioni di uva sultanina, carry e altre spezie per l'identificazione dei radicali formati a carico degli zuccheri secondo il protocollo EN 13780.

Tutti i campioni sono stati irradiati nel range di dose 0.5- 6 kGy e preparati seguendo le direttive previste dai rispettivi protocolli.

Le misure ESR sono state eseguite utilizzando uno spettrometro Bruker e-scan Food Analyzer; tale strumentazione è dotata di un sistema di auto-calibrazione e self-validazione mediante un film di alanina irradiata a dose nota ed inoltre è fornita di un software che grazie alla presenza di un marker, brevettato dalla Bruker, permette di calcolare il parametro *g* del segnale ESR dell'idrossiapatite.

Risultati e discussione

In figura 1 è mostrato il confronto tra lo spettro ESR di un campione di ossa di pollo irradiato a 6 kGy (a) e non irradiato (b), rappresentativo degli spettri ESR delle altre tipologie di ossa analoghi a questo.

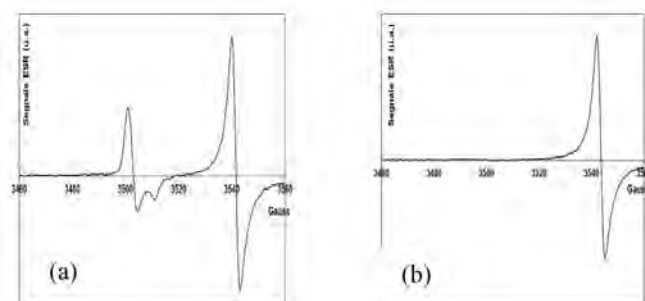


Fig.1: Spettro ESR di
un campione di pollo irradiato (a) e non irradiato (b)

Dall'analisi dello spettro del campione irradiato (a) si osservano due segnali ESR: il primo a campo magnetico più basso che è quello relativo al radicale che si forma a carico dell'idrossiapatite (componente principale delle ossa), specifico dell'irraggiamento; quello a campi più alti è invece il segnale ESR del marker che è presente nel portacampioni di cui è dotato lo spettrometro. Nello spettro b, invece è presente esclusivamente il segnale ESR del marker, confermando che il campione non ha subito trattamento radiante. Per rendere più sicura l'interpretazione del risultato, lo strumento è dotato di un software che grazie alla presenza del marker permette di calcolare il parametro *g* del segnale ESR dell'idrossiapatite, come richiesto per l'identificazione dal protocollo EN 1786-2000 che devono essere pari a $g_1 = 2.0020 \pm 0.001$ e $g_2 = 1.9980 \pm 0.001$. A titolo di esempio in tabella 1 è riportato il report relativo ai campioni di ossa di pollo di cui sono stati mostrati gli spettri ESR.

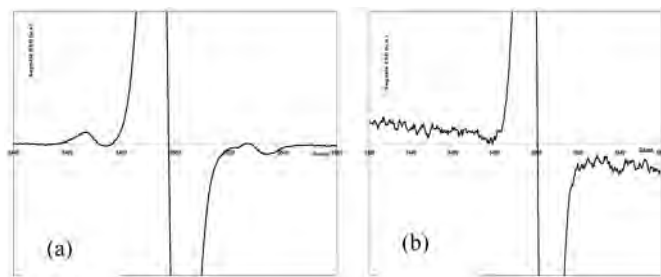
Tab.1: Report di identificazione di matrici contenenti ossa

Sample-ID	Date	g1-Value	g2-Value
Pollo 6 kGy-1A	22/02/2011	2,00179	1,99725
Pollo NI-1A	22/02/2011	1,99617	1,99113

In figura 2 è mostrato il confronto tra lo spettro ESR di un campione di pistacchio irradiato a 6 kGy (a) e non irradiato (b), rappresentativo degli spettri ESR delle altre tipologie di matrici analoghi a questo.

La comparsa nello spettro ESR del campione di pistacchio irradiato di due linee satelliti (imputato al radicale della cellulosa) rispetto al segnale endogeno già presente nel campione non irradiato (b) a distanza di 60 Gauss è il parametro secondo il protocollo EN 1787 per identificare l'avvenuto trattamento radiante. Non è previsto alcun software per l'elaborazione dello spettro.

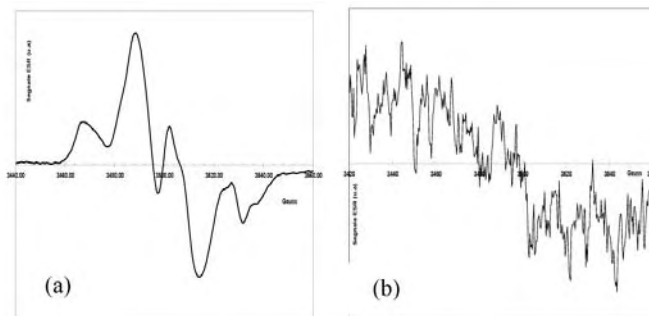
Fig.2: Spettro ESR di un campione di pistacchio irradiato (a) e non irradiato (b)



In figura 3 è mostrato il confronto tra lo spettro ESR di un campione di uva sultanina irradiato a 6 kGy (a) e non irradiato (b), rappresentativo degli spettri ESR delle altre tipologie di matrici contenenti zuccheri. La comparsa di un segnale

strutturato nello spettro ESR del campione irradiato è secondo il protocollo EN 13708 condizione per l'identificazione positiva dell'avvenuto irraggiamento.

Fig. 3: Spettro ESR di un campione di uva sultanina irradiata (a) e non irradiata (b)



I risultati ottenuti consentono di affermare che l'uso della Spettroscopia ESR può essere inserita nelle analisi di routine per l'identificazione degli alimenti irradiati in quanto permette di ottenere risultati affidabili. Inoltre è da sottolineare come l'utilizzo di tale apparecchiatura rende l'analisi accessibile ad operatori opportunamente formati ed addestrati ma non necessariamente altamente specializzati in spettroscopia ESR.

Bibliografia

1. World Health Organization (1994) – Safety and nutritional adequacy of irradiated food. WHO, Geneva.
2. EN 1786 - Foodstuffs - Detection of irradiated food containing bone
3. EN 1787 - Foodstuffs - Detection of irradiated food containing cellulose
4. EN 13780 - Foodstuffs - Detection of irradiated food containing sucrose

MYCOPLASMA BOVIS DA LATTE BOVINO: METODO BIOMOLECOLARE PER LA DETERMINAZIONE RAPIDA E L' IDENTIFICAZIONE DI SPECIE - RISULTATI PRELIMINARI

Carfora V., Marri N., Tammara A., Rosa G., Giangolini G., Giacinti G., Amatiste S.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

Key words: *Mycoplasma bovis*, PCR, Mastitis

ABSTRACT

A polymerase chain reaction (PCR) assay was developed for fast and easy identification of *Mycoplasma bovis* directly from broth culture and from typical colonies of *Mycoplasma* spp isolated by culture assay of 254 bovine milk samples.

INTRODUZIONE

Tra i micoplasmi, *Mycoplasma bovis* rappresenta il principale agente mastidogeno che colpisce i bovini anche se, come riportato da alcuni autori, altre specie di *Mycoplasma* come *M. alkalescens*, *M. bovigenitalium*, *M. californicum* e *M. canadense* possono essere comunemente associate a episodi di mastite (2). *M. bovis* può anche essere responsabile di malattie respiratorie, artrite e aborti (5). I micoplasmi sono microrganismi plastici e pleomorfi in quanto sprovvisti di parete cellulare, tale caratteristica determina dimensioni ridotte della cellula (0,2 – 0,4 µm) e del genoma (600.000 – 1.300.000 coppie di basi) (8). La maggior parte dei micoplasmi sono anaerobi facoltativi o microaerofili. Nelle colture in terreni solidi crescono molto lentamente, dando luogo a colonie che mostrano la zona centrale (corrispondente alla zona di crescita iniziale) approfondita nello spessore dell'agar e di aspetto più denso del resto della colonia, che assume un aspetto caratteristico a "uovo fritto". Inoltre, l'assenza della parete rende questi microrganismi resistenti alla maggior parte dei farmaci antimicrobici (4). Gli animali infetti eliminano *M. bovis* attraverso il tratto respiratorio per vari mesi infettando gran parte dell'allevamento. Altre vie di infezione sono il canale del capezzolo e il tratto genitale (seme infetto). Il contatto diretto tra individui è la più frequente causa di contagio mentre le infezioni ambientali sono teoricamente possibili ma non possono essere considerate tra le principali cause (6). Le mastiti causate da *M. bovis* possono essere clinicamente manifeste o non; le mastiti cliniche sono caratterizzate da un'iniziale rapida caduta della produzione di latte, un forte innalzamento delle cellule somatiche e da un aumento del volume della mammella, il secreto può essere di colore giallo citrico, in alcuni casi acquoso contenente materiale fioccoso, coaguli o pus (5, 2). Nelle mastiti subcliniche si riscontra comunque un innalzamento delle cellule somatiche. L'infezione da *M. bovis* negli allevamenti bovini ha una sostanziale importanza economica: individui sani vengono spesso infettati da soggetti asintomatici introdotti nell'allevamento. Una volta diffusa l'infezione, la sua eradicazione non è facilmente attuabile (5). I metodi microbiologici attualmente utilizzati per l'isolamento di *Mycoplasma* spp risultano essere lunghi e complessi (3), scopo del presente lavoro è riportare lo sviluppo di un metodo biomolecolare, in via di validazione, per la determinazione rapida di *M. bovis* da campioni di latte bovino e l'identificazione di specie dei ceppi di *Mycoplasma* spp isolati con l' esame culturale.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati 254 campioni di latte bovino individuale,

prelevati da soggetti con mastite clinica e/o sub-clinica, in allevamenti siti nella regione Lazio. I campionamenti sono stati effettuati una volta al mese da Gennaio a Giugno 2011. I campioni individuali costituiti da un pool di 20ml circa di latte proveniente dai quattro capezzoli sono stati prelevati previa disinfezione ed eliminando i primi getti di latte, conservati ad una temperatura di 4°C e sottoposti alle analisi di laboratorio entro 24 ore dall' arrivo. Sui campioni in esame sono state effettuate le seguenti analisi: esame batteriologico per l'isolamento e l'identificazione di microrganismi mastidogeni, enumerazione delle cellule somatiche mediante strumentazione automatizzata (Fossomatic 5000), analisi microbiologica per la ricerca del genere *Mycoplasma* e analisi di tipo biomolecolare sia per la determinazione rapida di *M. bovis* dai campioni di latte sia per l'identificazione di specie delle colonie tipiche di *Mycoplasma* spp precedentemente isolate mediante esame batteriologico. Analisi microbiologica per la ricerca di *Mycoplasma* spp. Dai campioni in esame è stato effettuato un pre-aricchimento trasferendo 0,2 ml di latte in 2 ml di Hayflick broth modificato (HFMB), incubato a 37°C in aerobiosi per 48-72 ore e una semina diretta di 20 µl su piastre di Hayflick Agar modificato (HFMA), incubate a 37°C in atmosfera modificata (5% di CO₂) per 48-72 ore (7). Le piastre sono state osservate sia a 48 e a 72 ore al microscopio ottico con ingrandimento 4x e 20x per la ricerca delle colonie tipiche a "uovo fritto"; in assenza di crescita, le brodocolture corrispondenti sono state inoculate in HFMB e HFMA, poi incubati nelle rispettive condizioni sopracitate. Ove necessario, le brodocolture sono state filtrate attraverso filtri sterili da 0.45 µm prima dei passaggi successivi. Le piastre, osservate al microscopio dopo 48 ore, in assenza di crescita sono state re-incubate sino al 7° giorno e controllate quotidianamente. In caso di assenza di crescita nelle piastre, è stato ripetuto lo stesso procedimento per altre due volte a partire dall'ultima brodocoltura. Le colonie riferibili a *Mycoplasma* spp sono state sottoposte ad analisi molecolare per l'identificazione di specie.

Analisi molecolare per la determinazione di *M. bovis* dai campioni di latte e per l'identificazione di specie delle colonie tipiche di *Mycoplasma* spp. Le cellule batteriche sono state processate per l'estrazione del DNA con modalità differenti a partire dalle brodocolture di prearricchimento o dalle piastre risultate positive all'esame culturale. Nel primo caso sono state allestite delle brodocolture trasferendo 0,2 ml di latte in 4 ml di HFMB, il DNA è stato estratto dopo 24-48 ore di incubazione a 37°C in atmosfera modificata (5% di CO₂). È stato prelevato 1 ml da ogni brodocoltura e centrifugato a 7500 rpm per 10 minuti, dopo aver eliminato il surnatante il pellet è stato risospeso in 1 ml di acqua distillata sterile e nuovamente centrifugato. Dopo aver eliminato il surnatante, si è proseguito all'estrazione del DNA genomico a partire dal pellet batterico utilizzando il kit di estrazione Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Nel secondo caso, al fine di ottenere un'identificazione di specie delle colonie tipiche di *Mycoplasma* spp isolate a seguito dell'esame batteriologico, è stata prelevata dalle piastre di HFMA una

quantità di colonie batteriche necessaria ad ottenere in acqua distillata sterile una sospensione con torbidità pari a 3 MacFarland. Le sospensioni così ottenute sono state sottoposte ad una temperatura di $97^{\circ}\text{C} \pm 2$ per 12 minuti, mantenute in ghiaccio per 5 minuti e centrifugate a 13000 rpm per 2 minuti. Il DNA presente nel surnatante e il DNA ottenuto mediante kit di estrazione sono stati sottoposti ad analisi in PCR per l'identificazione di *M. bovis*. Tale tecnica prevede l'amplificazione di un frammento di 447 bp appartenente al gene *mb-mp81* che codifica per una lipoproteina di membrana (P80) specie-specifica, tramite l'utilizzo della seguente coppia di primers: *mb-mp1F* (5'-TATTGGATCAACTGCTGGAT-3') e *mb-mp1R* (5'-AGATGCTCCACTTATCTTAG-3') (1). Le concentrazioni dei reagenti impiegati per l'allestimento della mix di reazione e il protocollo di amplificazione sono riportati in Tabella 1. Il DNA del ceppo di riferimento di *M. bovis* certificato ATCC 25523 è stato utilizzato come controllo positivo di reazione.

Tabella 1: Mix di reazione e protocollo di amplificazione

Mix di reazione (50 µl)		Protocollo di amplificazione	
Buffer	1x	94 °C x 5'	1 ciclo
MgCl ₂	1,5 mM		
dNTP _s	200 µM		
Mb-mp 1F	0,2 µM	94°C x 1'	35 cicli
Mb-mp 1R	0,2 µM	54°C x 1'	
Taq	0,75 U	65°C x 30"	1 ciclo
DNA	2 µl (50-100 ng)	68°C x 15'	

Gli amplificati, ottenuti tramite l'utilizzo di GeneAmp[®]PCR System 9700 (Applied Biosystems), sono stati esaminati tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio al 1,5% contenente Gel Red in tampone Tris-acetato-EDTA 1X e visualizzati con transilluminatore.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Dei 254 campioni esaminati, 16 campioni (con un range di cellule somatiche corrispondente a 145000-7900000/ml) hanno dato esito positivo per *Mycoplasma* spp all'esame batteriologico e per *M. bovis* all'analisi in PCR delle brodoculture, inoltre le colonie tipiche di *Mycoplasma* spp isolate su piastra, hanno dato esito positivo per *M. bovis* all'analisi in PCR. Tali dati mostrano una corrispondenza dei risultati ottenuti mediante il metodo biomolecolare diretto con quelli ottenuti tramite esame batteriologico e successiva identificazione delle colonie con metodo biomolecolare. Tale

considerazione potrebbe far ragionevolmente ipotizzare l'applicazione del metodo biomolecolare nelle fasi di screening preliminare riguardanti la ricerca di *M. bovis* in campioni di latte bovino e nelle fasi di completamento delle analisi microbiologiche per l'identificazione di specie delle colonie tipiche di *Mycoplasma* spp isolate su piastra. L'impiego di tale metodica, ha consentito di ottenere una diagnosi rapida di *M. bovis* riducendo notevolmente i tempi di analisi. Si ritiene opportuno effettuare ulteriori prove per completare la validazione del metodo biomolecolare, al fine di conseguire una maggiore semplicità operativa e agevolare l'interpretazione dei risultati per la diagnosi di mastite da *M. bovis*.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Foddai A., Idini G., Fusco M., Rosa N., de la Fe C., Zinellu S., Corona L., Tola S., 2005. Rapid differential diagnosis of *Mycoplasma Agalactiae* and *Mycoplasma Bovis* based on multiplex-PCR and PCR-RFLP. Molecular and cellular probes. **19**. 207-212.
- 2) Fox L.K., Kirk J.H., Britten A. 2005. Mycoplasma mastitis: a review of trasmission and control. Journal of Veterinary Medicine. **52**. 153-160.
- 3) Hassan W.H., Mona A.El-S., Hakim A.S., Azza S.M. Abuelnaga., Samy A.A., Sadek E.G., 2011. Comparison between molecular and classical techniques for identification of *Mycoplasma* species isolated from mastitic ruminants. Journal of American Science. **7**. 506-513.
- 4) Marouf S.A., Mohamed Kh. F., EL-Jakee J. 2011. Detection of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma bovigenitalium* in Cattle and Buffalo in Egypt using Dot ELISA and PCR with anti-microbial trials. European Journal of Biological Sciences. **3**. (1).
- 5) Maunsell F.P., Woolums A.R., Francoz D., Rosenbusch R.F., Step D.L., Wilson D.J., Janzen E.D., 2011. *Mycoplasma bovis* Infections in Cattle. Journal of Veterinary Internal Medicine. **25**. 772-783.
- 6) Punyapornwithaya V, Fox LK, Hancock DD, Gay JM, Wenz JR, Alldredge JR. 2011. Incidence and transmission of Mycoplasma bovis mastitis in Holstein dairy cows in a hospital pen: A case study. Preventive Veterinary Medicine. **98**. 74-78.
- 7) Thomas A., Sachseb K., Dizier L., Grajetzki C., Farnir F., Mainil J. G., Linden. 2003. Adherence to various host cell lines of *Mycoplasma bovis* strains differing in pathogenic and cultural features. Veterinary Microbiology. **91**. 101-113.
- 8) Worliczek H.L., Kämpfer P., Rosengarten R., Tindall B.J., Busse H. 2007. Polar lipid and fatty acid profiles – Re-vitalizing old approaches as a modern tool for the classification of mycoplasmas? Systematic and Applied Microbiology. **30**. 355-370.

ISOLAMENTO DI *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII* DA LATTE DI MASSA OVINO

Casalinuovo F.¹, Cillara G.², Sanna G.², Tola S.², Guarino A.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno-Portici;

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna

Key words: *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma* spp., sheep

ABSTRACT

In the period between 2010-2011, we collected 4 isolates of *Mycoplasma agalactiae* and 15 isolates of *Acholeplasma laidlawii* from 20 ovine flocks. *Acholeplasma laidlawii* isolates were identified by PCR assay using specific primers set.

INTRODUZIONE

Le mycoplasmosi rappresentano un gruppo di importanti patologie soprattutto dei ruminanti, alcune delle quali, come l'Agalassia contagiosa, in grado di provocare ingenti danni economici a carico delle produzioni delle aziende zootecniche dove compaiono, oppure altre che possono diventare seri problemi di sanità pubblica veterinaria, come la Pleuropolmonite contagiosa, sostenuta da *Mycoplasma mycoides* subsp. *specie mycoides* SC (MmmSC). Quest'ultima malattia, nonostante è stata eliminata in molti paesi, è ricomparsa in Europa negli anni '90, probabilmente in seguito sia alla importazione di animali dall'Africa, dove la malattia è endemica, che dalla riattivazione di ceppi di origine Europea, che evidentemente possono ancora persistere negli allevamenti europei, come suggeriscono anche studi recenti (9). L'Agalassia Contagiosa (AC) è una malattia degli ovini e caprini sostenuta da *Mycoplasma agalactiae*, cosmopolita, ad andamento epidemico, in grado di provocare mastiti, con brusche riduzioni della produzione di latte, artriti e cheratoconjuntiviti, a seconda del momento in cui avviene l'infezione si possono evidenziare anche episodi di polmonite, infezioni urogenitali e aborto. I danni economici provocati dalla malattia all'interno degli allevamenti sono molto rilevanti soprattutto in quelle aziende nelle quali il patogeno fa la sua comparsa per la prima volta. Proprio per la sua gravità, la malattia è compresa nella lista delle malattie soggette a denuncia nel regolamento di polizia veterinaria. A causa dei notevoli danni economici provocati, in numerosi paesi sono in atto piani di eradicazione e di controllo verso l'AC, piani che tuttavia sono limitati dall'indisponibilità di strumenti di tipo profilattico e/o terapeutico in grado di riuscire ad eliminare con certezza la patologia. Nonostante ciò, la profilassi vaccinale a base di vaccini spenti è molto utilizzata proprio per via della sua efficacia nel contenere i danni produttivi prodotti dalla malattia grazie alla mancata manifestazione della sintomatologia clinica, anche se i presidi immunizzanti utilizzati presentano tutti gli svantaggi dei vaccini spenti ed inoltre non prevengono l'infezione. La vaccinazione degli ovini verso *Mycoplasma agalactiae* è quindi ormai una componente sistematica e fondamentale dei programmi vaccinali di un allevamento ovino, con il rapporto costi/benefici favorevole per l'allevatore. Come conseguenza, il ricorso agli accertamenti diagnostici di laboratorio è sempre meno frequente, anche in assenza di una diagnosi clinica esaustiva, venendo quindi meno il monitoraggio sulla circolazione dei vari ceppi di *mycoplasma* negli allevamenti e le relative informazioni epidemiologiche di un dato territorio. A partire da queste considerazioni,

abbiamo ritenuto utile condurre uno studio sulla attuale presenza e circolazione di sierotipi di *mycoplasma* negli allevamenti ovini, utilizzando il metodo dell'isolamento batteriologico sul latte di massa aziendale proveniente da un significativo numero di allevamenti presenti sul territorio calabrese.

MATERIALI E METODI

Nel periodo 2010-2011, sono stati controllati n. 84 allevamenti di pecore da latte, per complessivi 17 mila capi (5,7% degli ovini ufficialmente censiti in Calabria), tutti a carattere stanziale e gestiti secondo i sistemi della pastorizia tradizionale familiare e trasformazione diretta in proprio del latte prodotto in formaggi pecorini. La consistenza media degli allevamenti era di circa 200 capi (numero minimo di capi presenti 20, numero massimo di capi presenti 667). La razza allevata è prevalentemente quella sarda, con una discreta presenza di altre razze quali la meticcica, la comisana e la gentile di Puglia.

Per ogni allevamento sono stati eseguiti 2 controlli a distanza di 6 mesi, per la ricerca di *Mycoplasma* spp con il metodo OIE di isolamento colturale (1), su campioni di latte di massa aziendale, utilizzando allo scopo i campioni di latte ufficialmente prelevati e conferiti per le determinazioni analitiche previste per nell'ambito del controllo qualità del latte ovino (carica batterica mesofita totale e conta delle cellule somatiche). Ciascun campione di latte, rappresentativo di mungiture, era stato prelevato direttamente dalla cisterna di refrigerazione poco prima di essere trasformato. Sono stati presi in considerazione solo gli isolati le cui colonie presentavano le tipiche caratteristiche riconducibili a *Mycoplasma* spp (aspetto "ad uovo fritto", con un centro granuleggiante chiamato "centro di approfondimento", circondato da un anello piatto e traslucido simile ad un velo). In seguito alle prove colturali effettuate sono stati collezionati 20 isolati di micoplasmi. Gli isolati sono stati clonati e fatti crescere in 200 ml di brodo di Hayflick modificato contenente 20% di siero equino a 37 °C fino alla fase logaritmica di crescita. I micoplasmi sono stati pellettati a 9.000 rpm per 30 min, lavati 2 volte con phosphate buffer saline (PBS, 0.1 M phosphate, 0.33 M NaCl, pH 7.4) e infine risospesi in 1/100 del volume originale. Successivamente si è proceduto all'estrazione di DNA e all'esecuzione della prova PCR. Il DNA è stato estratto con il metodo fenolo/cloroformio e infine risospeso in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0). L'identificazione degli isolati è stata fatta mediante reazioni di Polymerase Chain Reaction (PCR) utilizzando primers specifici per *M. agalactiae* (7), *M. putrefaciens* (5), *M. capricolum* (4), *M. arginini* (3), *M. mycoides* subsp. *capri* (3). I campioni negativi alle PCR specie-specifiche sono stati sottoposti ad un'ulteriore PCR utilizzando un set di primers che amplificano il gene 16S rRNA del "gruppo Hominis" (2). Gli amplificati sono stati sequenziali in entrambe le direzioni mediante il metodo di "terminazione della catena". Le

sequenze ottenute sono state analizzate con il programma on-line BLAST. A partire dalle omologie ottenute con BLAST, è stata applicata una PCR specifica per *Acholeplasma laidlawii* (6). Gli amplificati ottenuti sono stati fatti correre in un gel di agarosio all'1% in TAE 1x, colorati con bromuro di etidio e fotografati con l'apparecchio ImageMaster (Amersham).

RISULTATI

Dal latte di 20 allevamenti (23,8%) sono state isolate colonie caratteristiche riconducibili al genere *Mycoplasma* spp, mentre per i restanti allevamenti (76,2%) l'isolamento colturale ha dato esito negativo. Per 12 degli allevamenti positivi l'isolamento delle colonie caratteristiche è stato ottenuto su uno solo dei 2 campioni esaminati, mentre per i rimanenti 8 allevamenti la prova colturale è stata positiva su entrambi i campioni analizzati. Quest'ultimi sono stati ulteriormente controllati anche dopo il secondo prelievo per altre tre volte con cadenza mensile e per due allevamenti *Mycoplasma* spp è stato isolato rispettivamente fino al quarto e quinto controllo.

Per quanto riguarda il metodo d'isolamento colturale, maggiori positività si sono ottenuti al secondo passaggio dal terreno liquido su piastra, dopo la prima settimana d'incubazione. Gli isolati sono stati successivamente inviati presso il Centro di Referenza Nazionale per le Mastopatie Ovine e Caprine per la tipizzazione. Dei 20 isolati inviati, 4 sono stati identificati come *Mycoplasma agalactiae* mentre i restanti sono risultati essere *Acholeplasma laidlawii* (Figura 1)

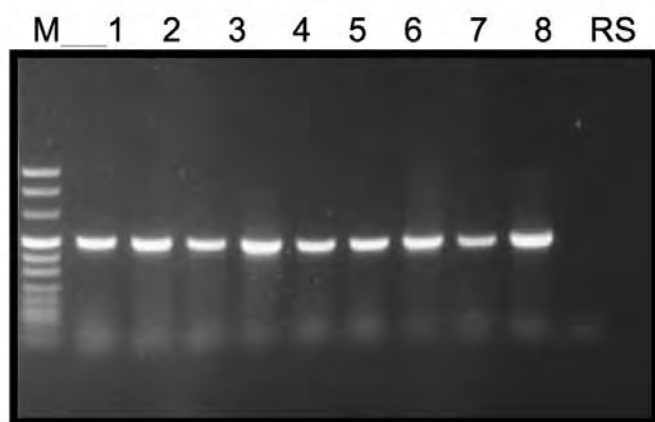


Figura 1- Corsa elettroforetica su gel di agarosio di amplificati da 505 bp ottenuti con il DNA di 8 isolati di *Acholeplasma laidlawii* (linee 1-8). Linea RS, Amplificato ottenuto con il ceppo di referenza P8 (ATCC). Linea M, marker VIII (Roche)

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti confermano la circolazione di ceppi di *Mycoplasma agalactiae* negli allevamenti di ovini da latte, nonostante le segnalazioni estremamente basse di malattia ed il ricorso sistematico a programmi di vaccinazione. Tuttavia una importante novità di questo lavoro riguarda l'isolamento di *Acholeplasma laidlawii* da campioni di latte ovino. *A. laidlawii* insieme a *Mycoplasma orale* e *Mycoplasma hyorhinis* sono le specie maggiormente implicate nelle infezioni primarie delle colture cellulari. Di recente l'*A. laidlawii* è stato isolato in Giappone da bovini provenienti dall'Australia (8). Ulteriori studi si rendono quindi necessari per meglio definire un eventuale ruolo dell'*A. laidlawii* nell'eziopatogenesi delle mastiti ovine, da valutare nella predisposizione e pianificazione di efficaci interventi di controllo delle mastopatie degli ovini.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Contagious agalactia, OIE Terrestrial Manual 2008, Charter 2.7.5., 992-998.
- 2) Giacometti M., Nicolet J., Johansson KE., Naglic T., Degiorgis MP., Frey J. (1999). Detection and identification of *Mycoplasma conjunctivae* in infectious keratoconjunctivitis by PCR based on 16S rRNA gene. J. Vet. Med. B 46: 173-180.
- 3) Hotzel H., Sachse K. and Pftzner H., A PCR scheme for differentiation of organisms belonging to the *Mycoplasma mycoides* cluster, *Veterinary Microbiology* 49 (1996), pp. 31-34.
- 4) Monnerat MP., Thiactourt F., Nicolet J., Frey J. (1999). Comparative analysis of the LppA locus in *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* and *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*. Vet. Microbiol. 69:157-172.
- 5) Peyraud A., Woubit S., Poveda JB., de La Fe C., Mercier P., Thiactourt, F. (2003). A specific PCR for the detection of *Mycoplasma putrefaciens*, one of the agent of the contagious agalactia syndrom of goats. Mol. Cell Probes 17:289-94.
- 6) Timenetsky J., Santos LM., Buzinhani M., Mettifofo E. (2006). Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. Brazilian J. Med. Biol. Res. 39: 907-914.
- 7) Tola S., Angioi A., Rocchigiani A.M., Idini G., Manunta D., Galleri G., Leori G. (1996). Detection of *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples by Polymerase Chain Reaction. Vet. Microbiol. 54:17-22
- 8) Uemura R., Sueyoshi M., Nagatomo H. (2010). Antimicrobial susceptibilities of four species of mycoplasma isolated in 2008 and 2009 from cattle in Japan. J. Vet.Med. Sci. 72:1661-1663.
- 9) Yaya A. - Manso-Silvàn L. - Blanchard A. - Thiaucourt F. (2008):Genotyping of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC by multilocus sequence analysis allows molecular epidemiology of contagious bovine pleuropneumonia Vet. Res. (2008) 39(2):149

CARATTERIZZAZIONE DI *MICROCOSMUS SULCATUS* (COQUEBERT, 1797): ANALISI DI METALLI PESANTI, OLIGOELEMENTI E RADIONUCLIDI γ -EMETTITORI

Chiaravalle A. E.¹, Carosielli L.², Bisceglia D.³, Ferrara A.¹, Bortone N.¹, Miedico O.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia

²ASL-FOGGIA Servizio Veterinario - Distretto Foggia Centro

³ASL-FOGGIA Servizio Veterinario - Distretto di Manfredonia

Key words: uova di mare, metalli pesanti, radionuclidi

SUMMARY

An investigation on the presence of metals and the most important radionuclides in samples of *Microcosmus sulcatus* collected along the Manfredonia-Mattinata coast was carried out. A method based on Inducted coupled plasma mass spectrometry was employed for the determination of the metals, while a method based on gamma spectrometry was used for analysis of radionuclides. Additionally these dates were compared with results obtained by analysing the presence of these elements in sample of *Modiolus barbatus* collected in the same area.

INTRODUZIONE

L'attuale e incessante incremento delle attività antropiche soprattutto a ridosso delle fasce costiere rende vivo e indispensabile l'interesse a valutare lo stato delle acque marine. Pertanto, il monitoraggio dei requisiti igienico-sanitari dei prodotti della pesca si conferma un efficace mezzo per la prevenzione e la salvaguardia dell'ambiente e della salute dell'uomo che si insedia in esso. A tale scopo, l'utilizzo di talune specie ittiche stanziali e dall'elevata capacità di filtrazione e di bio-accumulo ben si presta alla valutazione dell'ecosistema e della inquinazione marina¹. Nel presente lavoro è stato studiato il *Microcosmus sulcatus* (Coquebert, 1797), un ascidiaceo, organismo biofiltratore, gastronomicamente appetibile, meglio conosciuto come "uovo di mare" o "limone di mare" anche noto come "taratuffo". A forma di "otre", è costituito da un corpo racchiuso in un sacco muscoloso di colore bruno, ma privato della tunica appare di un intenso colore giallo-arancio o rosso. In virtù delle sue caratteristiche il *Microcosmus sulcatus* ben si presta per lo studio della inquinazione marina delle acque antistanti la costa, considerata la loro attitudine a vivere a profondità che vanno da 4 a circa 200 metri e alla enorme capacità di filtrazione: si stima, infatti, che gli esemplari più grandi filtrino circa 175 litri di acqua al giorno. Nella regione Puglia, attualmente, l'Ordinanza Regionale 30/12/2004 ne vieta la raccolta, il commercio, la vendita, la somministrazione nei pubblici esercizi ed il loro consumo. La suddetta ordinanza fece seguito a gravi episodi di intossicazioni da biotossine algali (PSP) riferibili al consumo di tunicati (*Microcosmus spp.*). Tuttavia abitudini popolari difficili da eradicare oppure casi fortuiti (lo si può infatti ritrovare adesivo ad altri prodotti della pesca come modiole, o "*Modiolus barbatus*" e arca di Noè o "*Arca Noae*"), portano il bandito "taratuffo" ad essere consumato. Risulta così interessante e doveroso approfondire gli aspetti igienico-sanitari e i risvolti di sanità pubblica legati a questo tunicato nell'attesa che il legislatore ritorni sulla questione.

MATERIALI E METODI

Campioni analizzati: Per l'attività di ricerca con finalità igienico-sanitarie, volta a valutare il contenuto di contaminanti inorganici e radionuclidi, è stato campionato nelle acque antistanti al litorale di Manfredonia-Mattinata (Golfo di Manfredonia) un numero totale di 100 esemplari di *Microcosmus sulcatus* nel periodo agosto-settembre 2009. Gli esemplari, dai 4 ai 12 cm, sono stati prelevati in quattro sessioni con l'ausilio di subacquei su fondale roccioso/sabbioso a 2,5÷3 miglia dalla costa ed a circa 7÷10 metri di profondità. Nello stesso periodo e nella stessa zona di pesca sono stati prelevati 40 esemplari di *Modiolus barbatus* (modiole o cozze pelose), su cui sono state condotte le medesime analisi al fine di confrontarne le proprietà di bioconcentrazione.

Ogni campione, posto in contenitori a basso contenuto di metalli e mantenuto ad una temperatura prossima a 0 °C, è stato conferito direttamente ai laboratori dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, sede di Foggia, al fine di eseguire le analisi sopra citate. Il protocollo sperimentale adottato prevede le seguenti fasi:

- preparazione dei campioni;
- determinazione dei metalli con tecnica ICP-MS;
- determinazione radionuclidi con spettrometria gamma;
- interpretazione dei risultati ottenuti.

Determinazione dei metalli con tecnica ICP-MS

Dopo l'apertura dell'esoscheletro, si è proceduto a separare la polpa dal liquido di governo e a renderla omogenea mediante omogeneizzatore ad immersione dotato di lame in ceramica, per minimizzare la contaminazione. Aliquote di circa 1,0 g di ciascun campione sono state mineralizzate in microonde con miscela HNO₃ (68% v/v) e H₂O₂ (120 volumi) entrambi di grado ultra-puro. La soluzione ottenuta è stata successivamente diluita a volume noto (50,0 ml) con acqua ultra-pura. Tutte le operazioni sono state effettuate sotto cappa a flusso laminare.

Sul mineralizzato è stata effettuata un'analisi quantitativa di 18 elementi in traccia ed ultra-traccia: Piombo, Stagno, Cadmio, Mercurio, Uranio, Arsenico, Cromo, Vanadio, Nichel, Molibdeno, Cobalto, Rame, Selenio, Alluminio, Calcio, Manganese, Zinco e Stronzio.

La tecnica analitica prescelta è la spettrometria di massa con plasma accoppiato induttivamente e lo strumento utilizzato è l'ELAN DRC II della Perkin Elmer, dotato di Cella Dinamica di Reazione. È stata eseguita una taratura esterna, con 4 standard acquosi (1% HNO₃). È da sottolineare che, grazie all'utilizzo di standard certificati mono-elemento, è stato possibile definire un range di taratura appropriato

per ciascun elemento in base alla concentrazione attesa ricavata dai dati di letteratura e di precedenti lavori².

Per gli elementi Al, As, Cr e V è stata adoperata la Cella Dinamica di Reazione (DRC) che, grazie a gas reattivi (es. NH₃, ammoniacale), consente di abbattere le interferenze spettrali isobare³.

Su ogni campione è stata effettuata l'analisi in doppio e per assicurare la qualità dei risultati è stato adoperato il materiale certificato CE-278 "muscle tissue" prodotto dall'IRMM.

Determinazione dei radionuclidi γ emittenti

Dopo le operazioni di preparazione, filtrazione e omogeneizzazione, comuni alla metodica dei metalli pesanti, aliquote dei campioni di circa 100 g sono state poste in contenitori a geometria cilindrica da 200 ml di tipo "Marinelli" e introdotte in uno spettrometro gamma ad alta risoluzione, modello "Oxford Instr. CP 25190" con rivelatore al Germanio iperpuro, avente efficienza relativa del 25% e operante nell'intervallo di energia da 40 keV a 2 MeV.

La taratura del sistema in energia e in efficienza è stata effettuata utilizzando delle sorgenti certificate multigamma. La gestione e l'elaborazione dei dati è stata effettuata tramite software *Inter Winner* della Euryses Mesures, dedicato all'identificazione automatica dei radionuclidi presenti nel campione ed al calcolo dell'attività della riga di emissione di interesse. Ogni campione è stato sottoposto ad un tempo di conteggio sufficiente ad identificare i picchi fotoelettrici di interesse (tempo di conteggio ≥ 12 ore).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nella Tabella 1 sono riportati i risultati analitici dei 18 metalli ed oligoelementi e dei radionuclidi ricercati nei campioni di *Microcosmus* e di modiola.

Elemento	<i>Microcosmus s.</i> (mg/kg)	<i>Modiola</i> (mg/kg)
U	0,061 \pm 0,019	0,10
Hg	0,011 \pm 0,002	0,031
Pb	0,19 \pm 0,04	0,96
Cd	0,020 \pm 0,003	0,68
Cr	0,41 \pm 0,14	0,41
As	8,17 \pm 1,26	10,6
V	1,58 \pm 0,22	3,74
Ni	0,40 \pm 0,05	2,22
Co	0,12 \pm 0,01	1,03
Mo	0,86 \pm 0,14	0,87
Cu	1,08 \pm 0,49	3,69
Se	1,91 \pm 0,38	0,74
Mn	14,6 \pm 0,8	35,2
Zn	33,8 \pm 2,5	33,6
Sr	1,74 \pm 0,36	1,38
Al	397 \pm 153	484
Ca	291 \pm 78	341
Sn	0,010 \pm 0,001	0,010

Radionuclide	<i>Microcosmus s.</i> (Bq/kg)	<i>Modiola</i> (Bq/kg)
K-40	453 \pm 47	386 \pm 19
Cs-134	<0,9*	<0,9*
Cs-137	<1,2*	<1,2*
Tl-208	1,6 \pm 0,6	1,23 \pm 0,53
Pb-212	3,63 \pm 1,82	2,41 \pm 0,83
Pb-214	11,8 \pm 2,9	9,01 \pm 1,27
Bi-214	47 \pm 13	12,17 \pm 1,69
Th-234	78 \pm 58	137 \pm 44

Dal punto di vista sanitario i metalli pesanti quali Pb, Cd e Hg risultano presenti con valori ben al di sotto dei limiti massimi indicati per molluschi bivalvi e prodotti della pesca nel Regolamento CE 1881/2006 e s.m.i. Inoltre, i livelli di accumulo degli elementi con maggiore rilevanza tossicologica sono decisamente inferiori se paragonati con quelli della modiola, mentre per As e Cr le concentrazioni riscontrate nelle due specie ittiche sono paragonabili. Il nichel è circa 5 volte meno concentrato nel *Microcosmus* rispetto alla modiola. Per quanto concerne il Selenio, si nota un tenore più che doppio nel tunicato rispetto al mollusco, mentre le concentrazioni di Cu, Mn e Co sono molto più consistenti nella modiola. Infine, di livello simile sono risultati Mo, Zn, Sr, Al e Ca. Da tutti questi dati si evince che la modiola (M.E.L.) sembrerebbe avere maggiori capacità di bio-accumulo, probabilmente per motivi biologici legati alla natura della specie ittica.

Per quanto riguarda i radionuclidi, non si è rilevato alcun elemento radioattivo che indichi una contaminazione da radioattività artificiale (Cs-134 e Cs-137) essendo inferiori alle rispettive M.A.R. (minima attività rilevabile) mentre le concentrazioni di attività dei radioelementi appartenenti alla serie naturale, sono confrontabili con quelle riscontrate per le stesse matrici in precedenti piani di monitoraggio e studi di caratterizzazione². Occorre tuttavia sottolineare che i dati relativi ai valori di concentrazione dei radionuclidi naturali si qualificano solamente come dati preliminari e da sottoporre ad attente analisi successive, visto il sempre crescente interesse della comunità scientifica nei confronti della radioattività ambientale la cui sorgente principale è costituita dai contributi forniti dai radionuclidi appartenenti alle tre diverse serie radioattive naturali (Uranio, Torio, Attinio).

I risultati sin qui discussi consentono di escludere attualmente un'emergenza di tipo sanitario legata all'assunzione di *Microcosmus sulcatus*, almeno per le sostanze xenobiotiche ricercate nel presente lavoro. Tuttavia, sono condivisibili alcune considerazioni di carattere igienico-sanitario: si tratta infatti di organismi di elevata portata di bio-filtrazione, che vivono in habitat marini le cui condizioni qualitative sono in continua evoluzione, soprattutto lungo le fasce costiere; inoltre occorre tenere presente il rischio legato alle sue modalità di consumo (quasi esclusivamente crudo); infine la mancanza di dati scientifici e le lacune legislative su un prodotto di nicchia come questo, sulla base del "Principio di Precauzione" (Reg. CE 178/2002), rendono ragionevole il divieto al consumo imposto dalla Regione Puglia.

CONCLUSIONI

Il presente lavoro conferma la nota e caratteristica capacità di filtrazione e bioaccumulo di *Microcosmus sulcatus* e avvalorata l'ipotesi di un loro possibile utilizzo come utile strumento per una più completa valutazione delle qualità delle acque, in modo da garantire l'acquisizione delle informazioni necessarie alla redazione dei piani di tutela da parte delle autorità statali e regionali. Infatti, i tenori dei contaminanti riscontrati potrebbero essere utilizzati per descrivere le caratteristiche del bacino idrografico e per valutare l'impatto antropico esercitato sul patrimonio costiero. Infine, data la scarsità dei dati riportati in letteratura, tale studio si configura anche come un tentativo per stabilire dei livelli di riferimento da cui partire per intraprendere futuri piani di monitoraggio e di valutazione del rischio alimentare associato al consumo di questi, come di altri prodotti provenienti dallo stesso comparto ambientale. Tali studi potrebbero aiutare il legislatore ad emanare idonea normativa in merito al consumo di tale prodotto, ad esempio, in maniera analoga ai molluschi

eduli lamellibranchi (M.E.L), individuando limiti chimici e microbiologici correlati alla valutazione del rischio connesso al loro consumo. Qualora risultasse possibile si potrebbero prevedere fasi di depurazione e/o il monitoraggio delle acque di pesca, finanche fornire indicazioni su modalità di consumo sicure.

BIBLIOGRAFIA

1. Papadopoulou C., Kanias G. (1977). Tunicate species as marine pollution indicators. *Marine Pollution Bulletin*, 810, 229-331.
2. Carrabs G., Carosielli L.A., Chiaravalle E., Mangiacotti M., Lanni L. (2007) Elementi in traccia e radionuclidi in *Microcosmus sulcatus* pescati nei mari Tirreno e Adriatico - Atti XVII Convegno A.I.V.I., p: 213-217
3. Cubadda F., Raggi A., Coni E. (2006) Element fingerprinting of marine organisms by dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry *Anal Bioanal Chem* 384: 887-896

MONITORAGGIO SULLA PRESENZA DI METALLI PESANTI ED OLIGOELEMENTI NEI MANGIMI COMMERCIALIZZATI IN PUGLIA

Chiaravalle A. E., Miedico O., Laconca L., Pompa C., Tarallo M.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia

Key words: monitoraggio, metalli pesanti, DRC-ICP-MS

SUMMARY

A monitoring study on the presence of metals in feed for different animal species was carried out using an inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP/MS). A total of 57 samples of different types were analyzed and the concentrations of the four contaminants (Hg, Pb, Cd and As) were compared with the law limits concentrations according to the Directive CE 32/2002, while the concentrations of principle oligo-elements (Se, Fe, Cu, Zn, and Mn) were compared with the values reported in the etichette of these products.

INTRODUZIONE

L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata è un ente sanitario di diritto pubblico facente parte del Servizio Sanitario Nazionale quale strumento tecnico ed operativo per la sanità animale, il controllo della salute e qualità degli alimenti di origine animale, l'igiene degli allevamenti ed attività correlate. La Struttura Complessa CHIMICA di codesto Istituto è deputata, tra gli altri compiti, al controllo ufficiale di alimenti e mangimi. Tale controllo è attuato mediante specifici piani di monitoraggio come il Piano Nazionale Residui (PNR) relativo agli alimenti destinati all'uomo e il Piano Nazionale di vigilanza e controllo sanitario sull'Alimentazione Animale (PNAA), relativo ai mangimi. Lo scopo è assicurare, in accordo a quanto già stabilito dal Reg. CE 882/2004, un sistema ufficiale di controllo dei mangimi lungo l'intera filiera alimentare al fine di garantire un elevato livello di protezione e di salute per gli animali e per l'uomo.

Ogni anno vengono eseguite sulle diverse tipologie di mangimi, prelevati dal Servizio Sanitario Locale, le analisi dei principali contaminanti quali Piombo (Pb), Cadmio (Cd), Mercurio (Hg) e Arsenico (As), i cui tenori massimi sono stabiliti dalla Direttiva CE 32/2002 e s.m.i. Inoltre vengono determinati e quantificati i principali oligoelementi quali Selenio (Se), Rame (Cu), Zinco (Zn), Ferro (Fe), Manganese (Mn), fondamentali per i vari processi fisiologici dell'animale.

Il presente lavoro mostra i risultati ottenuti su campioni di mangime pervenuti presso codesto Istituto tra il 2° semestre 2010 e il 1° semestre 2011.

MATERIALI E METODI

Campioni analizzati: Per lo studio di monitoraggio sono stati analizzati 57 campioni di mangimi commercializzati in Puglia di cui 12 destinati all'alimentazione per ovi-caprini, 18 destinati a bovini, 5 a suini, 5 ad equini, 5 a pollame, 7 a conigli, 2 a pesci, 1 agli animali da compagnia e 2 destinati a più specie animali. La tipologia dei mangimi analizzati è varia: sono prevalentemente mangimi complementari, completi e sfarinati, dove per complementari si intendono miscele di mangimi che contengono tassi elevati di alcune sostanze e che, per la loro composizione, assicurano la razione giornaliera soltanto se associati ad altri mangimi; per completi si intendono miscele di mangimi che da soli bastano ad assicurare una razione giornaliera; infine col termine sfarinati ci si riferisce a quelle materie prime (cereali) che vengono ridotti a farina o polvere. Le analisi chimiche effettuate

includono la ricerca di metalli pesanti ed oligoelementi utilizzando un metodo preventivamente validato presso il laboratorio della struttura semplice "Metalli Pesanti e Mangimi" del suddetto Istituto.

Preparazione del campione: La preparazione di ogni singolo campione ha previsto due passaggi fondamentali: omogeneizzazione e mineralizzazione. Nello specifico, circa 500 g di mangime sono stati macinati ed omogeneizzati mediante mulino a coltelli (modello FRITSCH Pulverisette 14 con griglia di diametro 0.5 mm); di questi, 0,50 g pesati su bilancia analitica e mineralizzati con 8 ml di acido nitrico, 2 ml di perossido di idrogeno e 100 µl di acido fluoridrico, utilizzando un forno a microonde.

Poiché la Normativa vigente impone di esprimere i risultati su un campione con tasso di umidità del 12%, si precisa che i risultati sono stati corretti per il contenuto di acqua libera proprio di ogni campione, determinato sperimentalmente secondo una appropriata procedura analitica (5,0 g in stufa a 103° C per circa 4 ore, secondo quanto previsto dal Reg. CE 152/2009).

Modalità di lettura: Dopo ottimizzazione delle condizioni operative e verifica delle performance strumentali, è stata effettuata la taratura esterna con range di calibrazione specifico per ogni elemento. Tutti i campioni sono stati diluiti di 4 volte per assicurare la stabilità della lettura strumentale e per rientrare nell'intervallo di taratura di ciascun elemento. La determinazione di Pb, Cd, Hg, Sn ed As, è stata eseguita in modalità STANDARD mentre per tutti gli altri analiti è stata adoperata la modalità con l'uso della cella dinamica di reazione (DRC) per eliminare selettivamente gli ioni interferenti isobari. Per ogni campione è stata effettuata l'analisi in doppio.

RISULTATI E DISCUSSIONI

Nella Tabella 1 sono riportati i risultati delle analisi dei contaminanti inorganici, tra i quali i più importanti sono regolamentati dalla Direttiva CE 32/2002: Pb, Cd, Hg e As. Si precisa che sono indicati i valori medi e il numero di campioni per ciascuna categoria di mangime.

Tipologia Mangime (N° campioni)	Hg	Cd	Pb	As	Cr	Ni
OVI-CAPRINI (12)	<LOQ	0,0621	0,270	0,146	1,431	2,310
BOVINI (18)	<LOQ	0,0838	0,231	0,116	2,227	6,970
SUINI (5)	<LOQ	0,0772	0,242	0,121	2,821	1,940
EQUINI (5)	<LOQ	0,0520	0,430	0,136	1,007	1,375
POLLAME (5)	<LOQ	0,0922	0,083	0,115	4,052	2,200
CONIGLI (7)	<LOQ	0,0906	0,542	0,201	3,730	2,760
PESCI (2)	39,4	0,4354	2,503	2,415	1,273	1,250
TUTTI (2)	<LOQ	0,0209	0,084	0,053	2,850	2,040
DA COMPAGNIA (1)	<LOQ	0,0499	0,209	0,491	1,261	1,130

Tabella 1: Concentrazione dei principali contaminanti inorganici, espressa in mg/kg, nelle diverse tipologie di mangime

Si nota che il contenuto di mercurio per tutti i campioni è risultato inferiore al Limite di Quantificazione (LOQ=0,025 mg/kg), ad eccezione del mangime per pesci, il cui tenore è di circa 0,040 mg/kg. Tale eccezione è da attribuirsi alla diversa natura della matrice, in quanto tali mangimi hanno in genere composizione mista (farine animali, olio e farine di pesce, glutine di frumento e/o granturco), che comprende anche derivati ittici a più elevato tenore di mercurio. Anche il tenore medio di Piombo per ogni tipologia di mangime è risultato notevolmente al di sotto dei limiti di legge, che vanno dai 10,0 mg/kg per le materie prime, ai 10,0 mg/kg dei mangimi complementari, ai 5,0 mg/kg per i mangimi completi. Anche per questo analita, il campione di mangime per pesci risulta molto più contaminato (2,5 mg/kg), pur non superando il limite imposto. Infine, anche per Cadmio e Arsenico possono valere le medesime considerazioni, in quanto i tenori medi non superano 0,10 e 0,50 mg/kg rispettivamente, ad eccezione ancora una volta del mangime per pesci, per il quale la succitata Direttiva ammette un limite di 10,0 mg/kg di Arsenico.

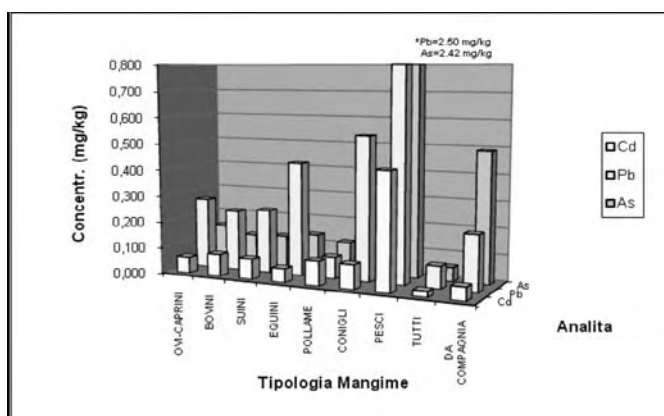


Grafico 1: Concentrazione dei contaminanti (Cd, Pb, As), espressa in mg/kg, nelle varie tipologie di mangime

Oltre alle considerazioni già riportate, dal Grafico 1 si denota una certa variabilità nel contenuto medio di Piombo tra le varie tipologie prese in esame. In particolare, i mangimi per equini e per conigli presentano un contenuto di questo contaminante sensibilmente maggiore rispetto alle altre categorie, che sono invece meno contaminate e più omogenee tra di loro (ovi-caprini, bovini, suini e animali da compagnia). Invece, per il Cadmio la distribuzione è decisamente meno variabile tra i diversi mangimi. Nella Tabella 2 sono riportati i risultati degli oligoelementi considerati nella Comunicazione della Commissione 2004/C 50/01 e nel Reg CE 767/2009 (Selenio, Ferro, Rame, Zinco e Manganese).

Tipologia Mangime (N° campioni)	Cu	Se	Mn	Zn	Fe
OVI-CAPRINI (12)	11,5	0,362	123	128	277
BOVINI (18)	20,2	0,354	128	131	387
SUINI (5)	17,7	0,368	83	94	272
EQUINI (5)	12,8	0,451	104	77	462
POLLAME (5)	14,6	0,250	148	91	220
CONIGLI (7)	18,7	0,294	141	107	588
PESCI (2)	17,9	1,632	58	215	400
TUTTI (2)	4,5	0,081	21	19	110
DA COMPAGNIA (1)	18,0	0,319	62	139	403

Tabella 2: Concentrazione dei principali oligoelementi, espressa in mg/kg, nelle diverse tipologie di mangime

Tutti i campioni oggetto del presente monitoraggio sono corredati da relativo cartellino descrittivo di composizione. La maggior parte di essi riporta un valore dichiarato di Selenio inorganico additivato pari a 0,50 mg/kg. Come si può osservare dai risultati riportati nella precedente tabella, i tenori medi misurati sono compatibili, entro le tolleranze consentite, con quanto dichiarato dai produttori; tuttavia si registra per tutte le tipologie esaminate un tenore sistematicamente inferiore al dichiarato. Per i mangimi destinati a più specie animali, il tenore di selenio è inferiore a 0,10 mg/kg, compatibilmente a quanto riportato nell'etichetta (tale oligoelemento non risulta additivato).

Tutti i mangimi analizzati presentano un contenuto di Rame simile a quanto riportato in etichetta (tra 12 e 20 mg/kg), ad eccezione dei mangimi destinati a più specie, in cui non risulta nessuna additivazione. Per quanto concerne lo Zinco, il contenuto di questo oligoelemento nei mangimi destinati a tutte le specie è nettamente inferiore (19 mg/kg) rispetto agli altri mangimi, in particolare ai mangimi per pesci che presentano un contenuto di Zinco pari a 215 mg/kg, quindi circa 10 volte superiore. Si nota che i mangimi destinati a più specie animali hanno un contenuto complessivo di tutti e cinque gli oligoelementi (Cu, Se, Mn, Zn, Fe) molto più basso rispetto alle altre tipologie esaminate, in accordo alle differenti esigenze nutrizionali delle specie a cui sono destinati.

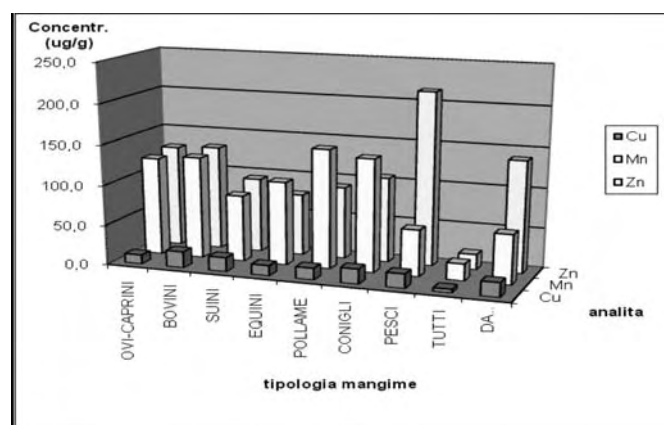


Grafico 2: Concentrazione di oligoelementi (Cu, Mn, Zn), espressa in mg/kg, nelle diverse tipologie di mangime

Infine per quanto riguarda Manganese e Ferro occorre sottolineare che le quantità riscontrate in ciascun campione sono nettamente superiori alle concentrazioni di additivazione dichiarate nell'etichetta, a causa della notevole quantità di analita "nativo". Ciò nasconde un problema di tipo applicativo delle norme in quanto i Regolamenti in vigore si riferiscono esclusivamente alle quantità additate e non alla quantità totale di analita presente.

CONCLUSIONI

In questo lavoro è stato monitorato, sulla matrice mangime, il tenore dei metalli pesanti, quali principali contaminanti inorganici di tali matrici, e degli oligoelementi, necessari per i processi fisiologici dell'animale. Il contenuto dei contaminanti (Pb, Cd, Hg e As) è risultato, seppure con una certa variabilità tra le diverse tipologie di mangimi esaminati, al di sotto dei limiti imposti dalla legge, a testimonianza del discreto stato igienico sanitario degli allevamenti in Italia ed

in particolare nelle zone direttamente controllate da codesto Istituto. Inoltre, il contenuto di oligoelementi (Se, Fe, Cu, Zn e Mn) è risultato conforme a quanto riportato nell'etichetta di ciascun campione, in particolare per quanto concerne il contenuto di Selenio, dove però bisogna registrare un sistematico scostamento per difetto dalla concentrazione dichiarata in etichetta. Pertanto, il presente lavoro, reso possibile sulla base dell'attività istituzionale dell' IZS di Puglia e Basilicata, consente di avere una visione globale sullo stato sia dei livelli di contaminazione degli alimenti ad uso zootecnico sia della concordanza tra quanto dichiarato in etichetta dai produttori di mangime e quanto realmente riscontrato nei singoli

campioni. Infine, occorre sottolineare il contributo scientifico per una maggiore conoscenza dei problemi tipici del settore mangimistico, allo scopo di sollecitare un aggiornamento delle attuali norme legislative.

BIBLIOGRAFIA

1. D'Mello J.P.F. – Contaminants and toxic in animal feeds WWW.fao.org/DOCREP/ARTICLE/AGRIPPA/X9500E04.HTM
2. Kan C.A., Meijer G.A.L. - The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed – Animal feed Science and Technology 133 (2007) 84-108

CONTAMINAZIONE AMBIENTALE DA DEIEZIONI DI CANI: PROBLEMA DI SALUTE PUBBLICA?

Cinquepalmi V.¹, D'Amato F.², Monno R.², De Vito D.², Soleo L.¹

¹Dip. Medicina Interna e Medicina Pubblica, ²Dip di Odontostomatologia e Chirurgia, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", Bari.

Key words: zoonosi, antibiotico – resistenza.

ABSTRACT

Pet animals and dogs in particular have increased in modern society. Dogs may have a potential for zoonotic infections and may represent a reservoir of bacteria resistant to antibiotics. We have analyzed 418 fecal samples of dogs collected on the streets of Bari, Italy for the presence of some bacteria and *Giardia* spp. *Campylobacter*, *Salmonella*, *Yersinia* were never isolated. *Giardia* was present in the 1.9 % of samples. *Enterococcus* spp. resistant to several class of antibiotics, including vancomycin, were also isolated. Only in 3 occasion MRSA strains, resistant to several antibiotics, were identified. Our data showed that public areas are contaminated with potentially pathogens and multiresistant strains of Gram positive bacteria representing a problem for the public health.

INTRODUZIONE

Nei paesi industrializzati il numero degli animali da compagnia è in aumento. Conseguentemente in alcune città è aumentato il numero di escrementi di cani lasciati per strada dai possessori degli stessi. Questo potrebbe rappresentare un problema di salute pubblica in quanto gli escrementi dei cani possono contenere e veicolare diversi microorganismi potenzialmente patogeni per l'uomo nonché batteri resistenti agli antibiotici trasmissibili all'uomo (1-3,5-7).

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare la presenza di alcuni microorganismi potenzialmente patogeni per l'uomo e di ceppi di batteri Gram - Positivi nonché la loro resistenza agli antibiotici in campioni di feci di cane.

MATERIALI E METODI

418 campioni di feci raccolti nelle strade di diversi quartieri della città di Bari sono stati testati per la presenza di *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia* con metodi tradizionali. La presenza di *Giardia* è stata valutata in 418 campioni con microscopia diretta e in 208 anche con metodo immunoenzimatico. Sono stati inoltre ricercati batteri appartenenti al genere *Enterococcus* e *Staphylococcus aureus* resistenti alla meticillina. I ceppi di *Enterococcus* sono stati testati per la sensibilità ad un pannello di antibiotici con metodo di Kirby - Bauer. Metodi molecolari sono stati utilizzati per la conferma del genotipo di resistenza in *Enterococcus* spp. con metodiche precedentemente descritte (4).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nessuno dei campioni esaminati è risultato positivo alla ricerca di *Salmonella*, *Campylobacter* e *Yersinia*. *Giardia* spp. è stata rilevata, con metodo immunoenzimatico, in 4 dei 208 campioni esaminati (1.9 %). In un campione furono occasionalmente riscontrate uova di *Toxocara* spp.

73 ceppi di *Enterococcus* spp. furono isolati da 68 campioni fecali. Le specie più frequentemente isolate sono state, nell'ordine: *E. faecium* (45/73, 61.6 %), *E. gallinarum* (17/73, 23.3 %), *E. casseliflavus* (4/73, 5.5%). Altre specie, incluso lo *E. faecalis* furono isolate con percentuali dell'1-2 %.

I ceppi di *Enterococcus* spp. sono risultati resistenti, nell'ordine, ai seguenti antibiotici: clindamicina (86.3%), tetraciclina (65.7 %), eritromicina (60.3%), ampicillina (47.9 %), penicillina (46.6%), piperacillina - tazobactam (43.8 %), amoxicillina - acido clavulanico (34%) e levofloxacina (23.3%). Una bassa percentuale di ceppi resistenti al cloramfenicolo (1.4%) è stata riscontrata.

La vancomicina - resistenza fu identificata nel 4.1 % dei ceppi di *Enterococcus* spp. ed in particolare in 2 ceppi di *E. avium* e in un ceppo di *E. durans*. Gli stessi ceppi sono risultati anche resistenti alla teicoplanina.

Indagini molecolari hanno confermato la identificazione biochimica dei ceppi di *E. gallinarum* in quanto, come è descritto in letteratura, questi ceppi possedevano il gene VanC1 e mancavano del gene VanC2-VanC3. Le stesse metodiche molecolari hanno confermato l'identificazione dei ceppi di *E. casseliflavus* in quanto era presente il gene VanC2-VanC3.

Solo in tre campioni di feci, pari allo 0.7%, furono isolati ceppi di *Staphylococcus aureus* che risultarono resistenti alla meticillina (MRSA). Inoltre questi ceppi risultarono resistenti non solo agli antibiotici beta-lattamici saggiati, caratteristica dei ceppi MRSA, ma anche ai carbapenemici saggiati (imipenem, meropenem ed ertapenem), alla tetraciclina, clindamicina ed eritromicina. 2 ceppi risultarono resistenti agli aminoglicosidi testati (amikacina e gentamicina) e tutti i 3 ceppi risultarono sensibili al cotrimossazolo e alla vancomicina e teicoplanina con MIC < 1mg/L.

In precedenti lavori *Giardia* spp. è stata identificata dal 19 % dei cani, sia pets che ricoverati in un canile in Toscana. La presenza da noi riscontrata, del 1.9% dei campioni suggerisce il ruolo dei cani come potenziale reservoir in ambiente cittadino, con possibili infezioni soprattutto in età pediatrica (1).

I ceppi di *Enterococcus* sono risultati resistenti alla vancomicina nel 4% dei casi e con una resistenza tra 86 % e 40% ad altri antibiotici. Anche se in particolare la vancomicina - resistenza è stata riscontrata in *E. avium* e in *E. durans*, specie raramente responsabili di infezioni nell'uomo, la possibilità di trasferimento di geni di resistenza ad *E. faecalis* ed *E. faecium*, più frequentemente isolati da infezioni umane, non può essere esclusa.

Sono stati condotti pochi studi sulla presenza di MRSA in animali da compagnia (7). Noi li abbiamo isolati solo in 3 campioni. I due ceppi presentavano inoltre multi resistenza a varie classi di antibiotici inclusi i carbapenemici, tetracicline, e a clindamicina ed eritromicina.

I campioni di feci da noi esaminati erano di recente e/o di vecchia deposizione e questo può aver ridotto il numero dei ceppi di *S. aureus* isolati, anche se si ritiene che lo *S. aureus* sia, tra i batteri asporigeni, uno tra i più resistenti. Ulteriori studi su tamponi rettali potranno indicare la reale incidenza di

MRSA in animali da compagnia. La presenza di MRSA in feci di cane, tenendo conto che i pets sono a stretto contatto con i loro possessori, fa ipotizzare una trasmissione di questi ceppi all'uomo o viceversa nonché la loro diffusione nell'ambiente (7). Inoltre anche ceppi di stafilococchi coagulasi-negativi, non sistematicamente ricercati in questo studio, sono risultati resistenti alla meticillina, a conferma del ruolo dei cani di compagnia come reservoir di ceppi resistenti agli antibiotici. I nostri dati confermano la presenza di protozoi potenzialmente patogeni, come peraltro di recente dimostrato da altri autori (9) nonché la presenza di ceppi resistenti agli antibiotici (1) in feci di cani presenti in ambiente urbano della nostra città, il che dovrebbe richiedere maggiore attenzione da parte delle autorità competenti rappresentando un problema per la salute pubblica.

BIBLIOGRAFIA

1. Bianciardi P., Papini R., Giuliani G. and Cardini G. 2004. Prevalence of *Giardia* antigen stool samples from dogs and cats. *Revue Vet.* 155: 417-442.
2. Capelli G., Paletti B., Iorio R., Frangipane di Regalbono A., Pietrobelli M., Bianciardi P., Giangaspero A. 2003. Prevalence of *Giardia* spp. in dogs and human in northern and central Italy. *Parasitol. Res.* 90: 145-155.
3. Damborg P., Olsen K.E., Moller Nielsen E. and Guardabassi L. 2004. Occurrence of *Campylobacter jejuni* in pets living with human patients infected with *C. jejuni*. *J Clin Microbiol* 42: 1363-1364.
4. Duktá-Malen S., Evers S. and Courvalin P. 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol* 33: 24-27.
5. Guardabassi L., Schwarz S. and Lloyd D.H., 2004. Pet animals as reservoir of antimicrobial-resistant bacteria. *J Antimicrob Chemother* 54: 321-332.
6. Nastasi A., Massenti M.F., Scarlata G., Mammina C., Calcò C., Villafrate M.R. 1986. *Salmonella* and *Yersinia enterocolitica* in soil and dogs faeces. *Boll Ist Sieroter Milan* 65: 150-152.
7. Rich M., Roberts L. 2004. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from companion animals. *Vet Rec* 154, 310.
8. Sato Y., Mori T., Koyama T. et al. 2000. *Salmonella* *Virchow* infection in an infant transmitted by household dogs. *J Vet Med Sci* 62: 767-9.
9. Tarsitano E, Greco G, Decaro N, Nicassio F, Lucente MS, Buonavoglia C., Tempesta M. 2010. Environmental monitoring and analysis of faecal contamination in an urban setting in the city of Bari (Apulia region, Italy): health and hygiene implications. *Int J. Environ Res Public Health* 7, 3972-3986.

SVILUPPO DI UN METODO ELETTROCHIMICO BASATO SULLA VOLTAMMETRIA SWASV PER LA DETERMINAZIONE DI PIOMBO E CADMIO IN PRODOTTI DELLA PESCA

Corrado F.** , De Roma A.** , Galiero G.** , Guarino A.** , Esposito M.** , Maglio P.** , Del Carlo M.* ,
Malascorta R.* , Compagnone D.*

*Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università degli Studi di Teramo

** Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno

Keywords: cefalopodi, metalli pesanti, voltammetria SWASV,

SUMMARY

The occurrence of toxic heavy metals in aquatic environment remains a severe problem because they can accumulate in fish and other organisms and require the safety assessment of food. The aim of this work is the validation of an electrochemical analytical protocol, based on SWASV, as screening method to detect heavy metals, namely Cd^{2+} and Pb^{2+} , in different fish matrix and the application to real samples.

INTRODUZIONE

I metalli pesanti sono componenti naturali della crosta terrestre tuttavia varie attività antropogeniche possono causare la loro immissione nell'ambiente, provocando una diffusa contaminazione soprattutto del suolo e delle acque. Gli organismi che vivono negli ambienti acquatici possono tollerare una certa concentrazione di tali sostanze e, se non sono in grado di eliminarle, tendono ad accumularle in vari organi. Bioaccumulo e biomagnificazione sono i due fenomeni che determinano la presenza dei metalli nella catena alimentare e quindi nei prodotti ittici che costituiscono un alimento di grande consumo (1). Alcuni di questi metalli, come elementi in tracce (ad es. rame, selenio, zinco) sono essenziali per il metabolismo del corpo umano ma per altri è nota la loro tossicità anche in basse concentrazioni. In particolare, il piombo e il cadmio sono tra i più pericolosi contaminanti alimentari ed una loro assunzione eccessiva può causare gravi patologie epatiche, ossee, renali oltre l'insorgenza di neoplasie (2). Al fine di tutelare la salute dell'uomo, la Commissione Europea ha fissato, con il Reg. (CE) 1881/2006 e succ.mod., i tenori massimi per alcuni metalli in alimenti destinati al consumo umano. Sono stati altresì stabiliti dei piani di controllo sugli alimenti a vari livelli della filiera, dall'importazione alla distribuzione, in maniera da verificare il rispetto di questi limiti massimi e quindi garantire la salute dei consumatori.

La metodica analitica di riferimento per il dosaggio dei metalli pesanti è la Spettroscopia di Assorbimento Atomico (AAS). Tale tecnica richiede lunghi tempi di analisi, alti costi di acquisto e gestione della strumentazione e può causare perdite di analita per evaporazione dovuta all'elevata temperatura di esercizio. Per questo motivo, crescente attenzione è stata rivolta alla individuazione di nuovi metodi analitici per uno screening dei metalli pesanti, rapido e a basso costo.

In questo ambito, il presente lavoro ha riguardato la messa a punto di una tecnica elettrochimica, la Voltammetria Di Ridissoluzione Anodica ad Onda Quadra (Square Wave Anodic Stripping Voltammetry, SWASV) per l'analisi di tali inquinanti nei prodotti della pesca. Questa tecnica sfrutta la capacità di alcuni anioni metallici di formare sali insolubili con il materiale di cui è composto l'elettrodo di lavoro e si sviluppa in due fasi successive: la preconcentrazione

dell'analita sull'elettrodo e la successiva ridissoluzione (stripping) della specie accumulata. La ridissoluzione avviene mediante una scansione di potenziale durante la quale viene misurata la corrente. Tale tecnica consente di quantificare simultaneamente Cd (II) e Pb (II), con limiti di rivelabilità inferiori ai $\mu g/l$, e potrebbe essere utilizzata come valida alternativa all'assorbimento atomico. Nello specifico, le analisi sono state svolte su campioni di molluschi cefalopodi un prodotto caratterizzato da un elevato valore nutrizionale e tra le più apprezzate dalla nostra ristorazione.

MATERIALI E METODI

I reagenti e i solventi necessari per le analisi sono stati forniti da Carlo Erba Reagenti e Merck. Tutte le operazioni sono state svolte senza mai utilizzare utensili in metallo. Le soluzioni di lavoro di cadmio e piombo sono state preparate al momento dell'uso. Per la verifica della validità del metodo, i campioni sono stati precedentemente analizzati con un metodo validato nel rispetto dei criteri previsti dal Regolamento (CE) 333/2007 e che utilizza l'assorbimento atomico, previa mineralizzazione mediante microonde.

Preparazione dei Campioni per analisi elettrochimica

I campioni di pesce sono stati omogenizzati dopo aver eliminato le parti non edibili (testa, lisca, pinne, interiora, guscio, esoscheletro). 5 g del materiale sono stati trattati con 5 ml di H_2O_2 31%. La miscela è stata incubata a 50 °C per 2 h, poi sono stati aggiunti 5 ml di HCl 37% e la temperatura è stata aumentata a 70 °C per 2 h. La frazione liquida della miscela è stata filtrata su carta e purificata tramite una colonna SPE con 0,5 g di C18 come fase stazionaria. La colonna è stata prima condizionata con 2 ml di metanolo e 2 ml di acqua e successivamente caricata con 3 ml dell'estratto del campione. Per garantire un recupero quantitativo degli analiti, la colonna è stata lavata con 3 ml di HCl 0,1M per due volte. I 3 eluati sono stati raccolti e utilizzati per l'analisi.

Per la validazione sono stati preparati campioni fortificati a tre livelli di concentrazione. Ad aliquote di 5 g di muscolo di un campione bianco sono stati aggiunti quindi 50 μl , 100 μl e 150 μl di una soluzione 50 ppm di Pb e Cd, per ottenere concentrazioni finali nel muscolo rispettivamente, di 0,5, 1,0 e 1,5 mg/kg.

Analisi elettrochimica

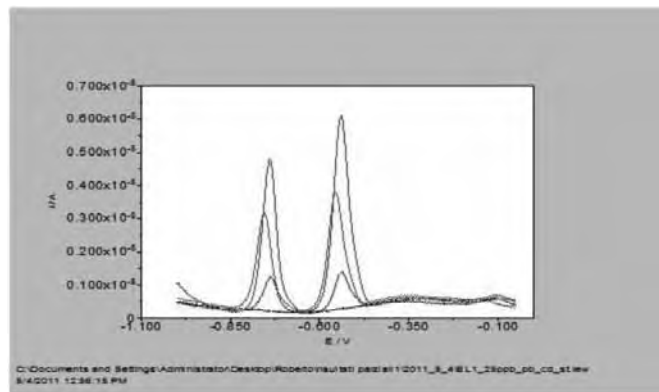
Per le analisi è stato utilizzato un potenziostato Autolab PGSTAT 12 (METROHM) con software GPES (General Purpose Electrochemical System) predisponendo un potenziale di condizionamento di -0,3 V per 60 sec, un potenziale di deposito di -1,1 V per 600 sec, un'ampiezza di onda quadra di 28 mV ed un potenziale di accumulo di 3 mV a 15 Hz. L'analisi è stata condotta seguendo il metodo previsto da Meucci (3), depositando su un elettrodo del tipo "screen printed" 100 ml di una soluzione 80 ppm di cloruro

di mercurio in HCl 0.1M, e applicando un potenziale di -1.1 V per 5 min. Ciò ha permesso la riduzione del mercurio, che passando dallo stato di ossidazione $2+$ a 0 , si deposita sulla superficie dell'elettrodo. Quest'ultimo è stato quindi lavato con una soluzione HCl 0.1M per 2 min. a -0.2 V e poi sono stati caricati 100ml della soluzione contenente gli analiti. A questo punto è stato applicato un potenziale di -1.1 V che ha permesso la riduzione degli analiti e la loro deposizione sul mercurio, formando un amalgama. In questo modo, durante la scansione SQW, gli analiti depositatisi scaricano, generando dei picchi di ossidazione. La posizione dei picchi ha permesso la discriminazione della specie metallica e la loro altezza ha invece fornito informazioni relative alla loro quantità.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Per la validazione di un nuovo metodo si è proceduto prima alla determinazione del contenuto di Pb e Cd totale mediante spettrofotometria di assorbimento atomico con fornetto di grafite. Questa analisi ha previsto la mineralizzazione dei campioni, eseguita per via umida, mediante forno a microonde. La sperimentazione è stata effettuata su dodici diversi campioni tra cefalopodi, di cui 6 calamari, 2 totani, 2 polpi, 1 seppia e 1 mazzancolla prelevati sul mercato in esecuzione di controlli ufficiali. È stata condotta prima l'analisi del bianco, consistente nella lettura della soluzione tampone (HCl 0.1M) e ripetuta più volte allo scopo di verificare l'assenza di contaminazioni sia sull'elettrodo che nella soluzione stessa. Successivamente sono state analizzate soluzioni a differenti concentrazioni, con tempi di deposizione diversi, prima del piombo, poi del cadmio, e infine soluzioni miste, derivando le relative calibrazioni.

Figura 1 Voltammogramma di una soluzione 100 ppb mista Pb/Cd a tre tempi di deposizione (60, 300 e 600s)



A questo punto sono stati analizzati i campioni mineralizzati, per i quali è stata verificata l'assenza di interferenti ai potenziali di interesse ma, eccetto il campione S12, non è stato possibile ottenere un segnale sufficientemente sensibile.

Al contrario, migliori risultati sono stati ottenuti svolgendo l'analisi dei campioni non pretrattati, utilizzando per l'estrazione dei metalli non la mineralizzazione, ma la tecnica della digestione e successiva purificazione mediante colonne SPE. E' stata ottenuta una risposta lineare sia per il piombo che per il cadmio e la scarica a diversi potenziali ha reso possibile la loro discriminazione (Pb^{2+} a $-0.75V$, Cd^{2+} a $-0.55V$). E' stata poi svolta l'analisi a diversi tempi di deposizione e una calibrazione della matrice utilizzando un gruppo di campioni nell'intervallo di concentrazione di 50-250 ng/ml.

In Tabella 1 sono riportati i risultati dei 12 campioni, analizzati sia con AAS che con metodi elettrochimici.

Tabella 1. Confronto dei risultati ottenuti in SWASV vs AAS

	Cd mg/kg	Cd mg/kg	Pb mg/kg	Pb mg/kg
	AAS	EC	AAS	EC
S1	0.059	0.106	0.016	0.016
S2	0.188	0.170	0.036	0.040
S3	0.006	<lod	0.050	0.017
S4	0.021	<lod	0.023	0.015
S5	0.462	0.397	0.019	0.029
S6	0.010	<lod	<0.020	0.017
S7	0.171	0.099	0.315	0.020
S8	0.073	0.099	<0.020	0.018
S9	<0.005	<lod	0.041	0.018
S10	0.008	<lod	0.020	0.034
S11	0.453	0.793	0.026	0.032
S12	2.000	2.370	0.085	0.063

* lod= limite di rilevabilità

Dai risultati ottenuti si può notare che, sia per il Cd che per il Pb, si ottengono picchi rilevabili per campioni che in partenza avevano una contaminazione di almeno 0.080 mg/kg. In generale è emersa una soddisfacente correlazione fra i risultati ottenuti con entrambi i metodi, osservando in alcuni casi una leggera sottostima con il metodo elettrochimico. Tutti i campioni, tranne S12 per il Cd, erano sotto il livello massimo (1.0 mg/Kg) per entrambi i metalli, definito nel Regolamento (CE) 1881/2006.

CONCLUSIONI

Il metodo proposto per la determinazione di Cd e Pb in cefalopodi si è rivelato un valido sistema di screening qualitativo. Infatti i due metalli sono rintracciabili al LM, risultano ben discriminati e non si rilevano interferenze da parte della matrice. Il recupero dei metalli nelle soluzioni standard dopo il passaggio in colonne SPE è soddisfacente, perchè le soluzioni non si arricchiscono né perdono analita.

Sviluppi futuri riguardano un ulteriore lavoro di ottimizzazione della fase di digestione/purificazione del campione, necessario per rendere il metodo utilizzabile anche come screening quantitativo. L'analisi di campioni reali, già svolta con il metodo di riferimento in AAS, ha dimostrato che il metodo proposto consente di determinare la presenza dei contaminanti ai livelli di concentrazione realmente presenti, sebbene non sempre si ottengono valori accurati da un punto di vista quantitativo.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Chapman P., Rhomberg G., Vigers G., Water J., (1982) *Design of monitoring studies for priority pollutants*, J. Water Pollut. Control Fed.; 54: 292-297.
- 2) Rojas E, Herrera LA, Poirier LA, Ostrosky-Wegman P., (1999) *Are metals dietary carcinogens?*, Mutat Res.;443(1-2):157-81.
- 3) Meucci V., Laschi S, Minunni M., Pretti C., Intorre L., Soldani G., Mascini M., (2009) *An optimized digestion method coupled to electrochemical sensor for the determination of Cd, Cu, Pb, and Hg in fish by square wave anodic stripping voltammetry* Talanta;77(3):1143-8.

CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI CEPPI DI *STAPHYLOCOCCUS PSEUDINTERMEDIUS* METICILLINO RESISTENTI ISOLATI IN UN ALLEVAMENTO DI CANI DEL VENETO

¹Corrò M., ²Rota A., ³Milani C., ¹Drigo I., ¹Perin R., ⁴Börjesson S.

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD); ²Dipartimento di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Grugliasco (TO); ³Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Facoltà di Medicina Veterinaria, Legnaro (PD); ⁴Department of Animal Health and Antimicrobial Strategies, National Veterinary Institute (SVA) Uppsala (S)

Key-word: MRSP, caratterizzazione genetica, cani da riproduzione.

ABSTRACT

This study was carried out in a breeding kennel where antimicrobial agents were used on bitches around parturition, without any veterinary control. Swabs from 5 body areas and milk of 8 bitches were analysed and *Staphylococcus pseudintermedius* was isolated. Susceptibility to antimicrobials, presence of *mecA* gene and genetic characterization on MRSP strains were carried out. Sixteen out of the 29 *S.pseudintermedius* strains isolated from 5 bitches were MRSP. All MRSP strains resulted multi-drugs resistant, *spa*-type t02 and carried *SSCmec* II-III. PFGE showed that they were related and belonged to the major clone lineage dominating in Europe, the ST71-J-t02-II-III.

INTRODUZIONE

L'uso improprio di antibiotici negli allevamenti di cani, specialmente nelle fattrici nel periodo del parto al fine di ridurre la mortalità neonatale, può portare alla selezione di ceppi batterici resistenti (7). Negli ultimi anni si segnala un preoccupante aumento della frequenza d'isolamento di ceppi di *Staphylococcus* sp. coagulasi positivi meticillino-resistenti nell'uomo e negli animali. La resistenza alla meticillina è dovuta alla presenza del gene *mecA*, che codifica la sintesi di una proteina di membrana alterata, caratterizzata da scarsa affinità per gli antibiotici β -lattamici. Lo stafilococco coagulasi positivo più diffuso nel cane è *S. pseudintermedius*, componente della normale flora microbica di cute e mucose e occasionalmente responsabile d'infezioni. Ceppi meticillino-resistenti di tale specie (MRSP) sono stati isolati sia da animali con ferite infette, dermatiti, otiti, sia da soggetti sani (7, 10). I ceppi MRSP isolati in Europa mostrano caratteristiche genetiche molto simili tra loro, pertanto si ipotizza derivino da un clone unico mutato. Tali ceppi presentano inoltre resistenze a un numero elevato di antibiotici appartenenti a famiglie farmacologiche diverse (multi-resistenza) (2) e rappresentano pertanto un serio problema per la sanità animale. Non è esclusa inoltre la possibilità che possano essere trasmessi all'uomo (2, 10) o che possano costituire un serbatoio di resistenze trasmissibili ad altre specie batteriche saprofiti o patogene per animali e uomo.

Scopo del lavoro è stato quello di evidenziare la presenza di ceppi MRSP in una popolazione di cani da riproduzione, ospitati in un allevamento che da anni fa largo uso di antibiotici e di confrontare le loro caratteristiche genetiche con quelle di altri ceppi MRSP isolati in Italia e in Europa.

MATERIALI E METODI

L'allevamento oggetto dello studio, situato nel Veneto, ospita in media 11 femmine e 4 maschi di razza Boxer; nel corso dell'anno si hanno circa una decina di parti. I cani vivono in box singoli, ma condividono spazi comuni per

l'esercizio all'aperto. Per ridurre la mortalità neonatale, sono stati utilizzati, negli anni, diversi antibiotici nelle fattrici in prossimità del parto (cefalosporine di III generazione, fluorchinoloni, macrolidi), per lo più somministrati su iniziativa dell'allevatore senza controllo veterinario. Per l'isolamento e l'identificazione degli stafilococchi coagulasi positivi, si sono eseguiti tamponi da narici, bocca, capezzoli, cute delle ascelle, vagina dalle 8 fattrici presenti in allevamento al momento dell'indagine e sono stati prelevati campioni di latte dai due soggetti in lattazione. I campioni sono stati seminati in Agar Sangue con 5% di sangue di montone e incubati in aerobiosi a 37°C per 24 ore. Per l'identificazione di genere e di specie si sono utilizzate prove biochimiche e biomolecolari: test della coagulasi; identificazione fenotipica mediante API Staph 32 ID (BioMérieux, France), PCR per conferma di specie (1, 7). I ceppi isolati sono stati saggiati per valutare le caratteristiche di antibiotico-resistenza mediante: a) il test della diffusione in agar (metodo Kirby Bauer): utilizzando un pannello di 15 principi attivi rappresentativi delle principali classi farmacologiche (tabella 2). Per l'esecuzione della metodica, l'interpretazione degli aloni di inibizione alla crescita e il controllo di qualità si sono seguite le linee guida del Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI);

b) prova di crescita su terreno selettivo differenziale ORSAB (Oxacillin Resistance Screening Agar Base, Oxoid, Basingstoke, United Kingdom), addizionato con oxacillina (4µg/ml).

I ceppi resistenti all'oxacillina sono stati sottoposti a PCR per la ricerca del gene *mecA* (3, 7) per confermare la meticillino-resistenza.

I ceppi MRSP sono stati caratterizzati geneticamente con le metodiche di seguito riportate, applicando i protocolli d'indagine e gli schemi identificativi descritti in bibliografia:

1) *Spa*-typing (4) con le seguenti sequenze di primer: 5'-AATAATTCA e 3'-GACAAGCG (8).

2) *SCCmec* types I – V: mediante PCR-RT Multiplex, associata a PCR convenzionale per differenziare *SCCmec* III lacking *SCC-Hg*, *SCCmec* II-III e *SCCmec* VII-241 (6).

3) *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) (5), seguendo i criteri proposti da Tenover *et al.* (2009) per i ceppi batterici, per l'interpretazione dei cluster di frammenti di DNA ottenuti in campo pulsato (9).

RISULTATI

In totale sono stati isolati 29 ceppi di stafilococco coagulasi positivo, identificati come *S. pseudintermedius*; di questi 16 sono risultati oxacillina resistenti e *mecA* positivi (55%). I ceppi MRSP sono stati isolati da 5 delle 8 fattrici esaminate, ed evidenziati in una o più sedi di prelievo (tabella 1). In particolare in un soggetto, i ceppi MRSP sono stati isolati in alta carica e in coltura pura da tutti i campioni, incluso il latte. In tutti gli altri casi nelle colture batteriche erano

contemporaneamente presenti sia ceppi MRSP, sia ceppi oxacillino-sensibili, *mecA* negativi.

I risultati dell'antibiogramma eseguito sui ceppi MRSP sono riportati nella tabella 2, caratteristica comune è la resistenza a un ampio numero di antibiotici: 14 su 15 principi attivi saggiati.

La caratterizzazione genetica ha evidenziato che i ceppi MRSP isolati in allevamento sono tra loro indistinguibili e appartengono a un unico clone con le seguenti caratteristiche: *spa* type t02, *SCCmec* II-III e lo stesso pulso-tipo evidenziato tramite PFGE.

DISCUSSIONE

L'uso eccessivo di antibiotici nell'allevamento di cani e la somministrazione di routine alle fattrici in prossimità del parto, indipendentemente da problematiche di tipo batterico, sono senza dubbio fattori importanti per la selezione di ceppi MRSP (7). Tuttavia in alcuni allevatori si è radicata la convinzione che tale pratica possa controllare o ridurre la mortalità neonatale; le conseguenze nel tempo sono invece deleterie, perché i ceppi resistenti selezionati nelle fattrici con la somministrazione di farmaci e trasmessi ai cuccioli subito dopo il parto, possono rendere inefficace, in caso di necessità, il futuro utilizzo di antibiotici.

Non si hanno ancora conoscenze sulla persistenza dei ceppi MRSP negli animali e nell'allevamento una volta interrotta la somministrazione dei farmaci, benché alcuni autori siano dell'idea che la loro presenza tenda a ridursi nel tempo fino a scomparire negli animali e nell'ambiente (10).

La caratterizzazione genetica dei ceppi MRSP ha confermato la presenza in allevamento di ceppi originatisi probabilmente da uno stesso clone mutato: ST71-J-t02-II-III che è predominante in Italia e in Europa (6, 8). I ceppi presentano inoltre caratteristiche di multi-resistenza.

La presenza di ceppi MRSP negli animali e la loro diffusione nell'ambiente rappresentano un problema emergente in sanità animale poiché vanificano la maggior parte dei protocolli terapeutici applicati in caso di patologia. Non va sottovalutata inoltre l'evenienza che tali microrganismi possano essere trasferiti da un animale all'altro e che l'uomo possa svolgere un ruolo di primaria importanza come vettore meccanico in quegli ambienti dove si verifica uno stretto contatto uomo-animale infetto: ambulatorio veterinario, allevamento, ecc. Poco probabile è invece il rischio che ceppi

MRSP possano provocare direttamente patologie nell'uomo (zoonosi), rare sono, infatti, le segnalazioni in tal senso (2). Più preoccupante è invece l'ipotesi che i fattori di resistenza presenti nei ceppi MRSP possano essere trasferiti ad altre specie batteriche conferendo a quelle patogene per uomo e animali nuove caratteristiche di antibiotico-resistenza.

Per tale motivo è di fondamentale importanza un uso consapevole e appropriato del farmaco veterinario al fine di evitare la selezione e la diffusione di ceppi batterici resistenti nell'ambiente.

BIBLIOGRAFIA

1. Bannoehr J, Franco A, Iurescia M, Battisti A, Fitzgerald JR. Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. J Clin Microbiol 2009; 47: 469-71.
2. Burnens R, Maranta A, Perreten CA, J Human infection associated with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71 Antimicrob Chemother 2010, 65, 2047-2048.
3. Louie L, Goodfellow J, Mathieu P, Glatt A, Louie M, Simor AE. Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci from blood culture bottles by using a multiplex PCR assay. J Clin Microbiol 2002; 40: 2786-90.
4. Moodley A, Stegger M, Ben Zakour NL, Fitzgerald JR, Guardabassi L (2009) Tandem repeat sequence analysis of staphylococcal protein A (*spa*) gene in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. Vet Microbiol 135, 320-326.
5. Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, de Ryck R, Struelens M, Zinn CE, Fussing V, Salmenlinna S, Vuopio-Varkila J, El Solh N, Cuny C, Witte W, Tassios PT, Legakis N, van Leeuwen W, van Belkum A, Vindel A, Laconcha I, Garaizar J, Haeggman S, Olsson-Liljequist B, Ransjö U, Coombes G, Cookson B (2003) Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. J Clin Microbiol 41, 1574-1585.
6. Perreten V, Kadlec K, Schwarz S, Grönlund Andersson U, Finn M, Greko C, Moodley A, Kania SA, Frank LA, Bemis DA, Franco A, Iurescia M, Battisti A, Duim B, Wagenaar JA, van Duinkerken E, Weese JS, Fitzgerald JR, Rossano A, Guardabassi L. Clonal spread of methicillin-resistant

Tabella 1: dettaglio isolamenti MRSP dalle fattrici.

Cani MRSP positivi (5/8)	Bocca	Narici	Ascella	Capezzoli	Vagina	Latte
Femmina 9 mesi	X		X	X		No
Femmina 19 mesi					X	No
Femmina 3 anni	X	X	X	X	X	X
Femmina 4 anni	X	X	X			X
Femmina 10 anni				X	X	No
						No
Totale MRSP	3/6	2/5	3/7	3/6	3/3	2/2
% MRSP	50	40	43	50	100	100

no = non eseguito, animali non in lattazione)

Staphylococcus pseudintermedius in Europe and North America: an international multicentre study. J Antimicrob Chemother 2010; 65: 1145-1154.

7. Rota A, Milani C, Drigo I, Drigo M, Corrà M. Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from breeding dogs. Theriogenology 2011; 75: 115-121.

8. Ruscher C, Lubke-Becker A, Semmler T, Wleklinski CG, Paasch A, Soba A, Stamm I, Kopp P, Wieler LH, Walther B (2010) Widespread rapid emergence of a distinct methicillin- and multidrug-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) genetic lineage in Europe. Vet Microbiol. Vet Microbiol 144, 340-346.

9. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 33, 2233-2239.

10. Van Duijkeren E, Kamphuis M, van der Mije IC, Laarhoven LM, Duim B, Wagenaar JA, Houwers DJ (2011) 9. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* between infected dogs and cats and contact pets, humans and the environment in households and veterinary clinics. Vet Microbiol 150, 338-343.

Tabella 2: Ceppi MRSP profilo di antibiotico-resistenza.

Ceppi MRSP	1-16
Pannello principi attivi	S/I/R
Penicillina	R
Ampicillina	R
Amoxicillina-acido clavulanico	R
Oxacillina	R
Cefalosporine I generazione	R
Cefalosporine III generazione	R
Spiramicina	R
Eritromicina	R
Tilmicosina	R
Tilosina	R
Tetraciclina	R
Licosamidi	R
Enrofloxacin	R
Sulfametossazolo-Trimethoprim	R
Tiamulina	S

ASPETTI IGIENICO-SANITARI E QUALITATIVI DI MOLLUSCHI CEFALOPODI AL COMMERCIO

Costa A., Alio V., Russo Alesi E. M., Sciortino S., Di Noto A. M.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A.Mirri" Palermo

Key words: cephalopods, microbiological and parasitology analysis, sanitary control

SUMMARY

The authors report preliminary results of microbiological and parasitology examinations carried out on 50 cephalopods captured in the Western of Sicily during 2010. Several strains belonging to *Pseudomonas* spp and *Vibrio alginolyticus* were isolated in *Eledone moscata* and in *Loligo vulgaris*. No pathogenic strains were isolated (*Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio* spp). In one sample of *Todarodes sagittatus* was detected *Anisakis* Type I and was identified as belonging to *A. pegreffii* by PCR-RFLP.

INTRODUZIONE

I molluschi cefalopodi, commercializzati sia freschi che congelati, sono prodotti della pesca la cui importanza nel campo alimentare si è incrementata negli ultimi anni anche in Italia e, di conseguenza il loro commercio e consumo. Nei Paesi del Mediterraneo i Cefalopodi vengono utilizzati per il consumo umano fin dall'antichità, mentre in zone del Pacifico e dell'Atlantico hanno assunto un ruolo importante solo di recente. Negli ultimi decenni si è assistito a livello mondiale ad un rapido incremento della pesca di questi molluschi, sia per un miglioramento delle tecniche di pesca, sia per un improvviso aumento della richiesta che ha dato impulso al commercio internazionale: attualmente la Cina rappresenta il primo paese produttore, seguito da Perù e Giappone (1). I Cefalopodi comprendono decapodi (seppie, totani e calamari), e ottopodi (polpi e moscardini) (5) e sono sottoposti come da normativa ad un controllo sanitario comprendente tra l'altro lo stato di freschezza, la qualità microbiologica e l'eventuale presenza di parassiti (Reg 853/2004 All III Capo II). Come tutti i prodotti della pesca costituiscono dei prodotti alimentari facilmente deteriorabili e soggetti a contaminazione (5): oltre alla flora microbica autoctona saprofita, componente tipica delle acque marine (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alteromonas*) e responsabile dei processi di deterioramento post-mortem (*fish spoilage*), possono essere veicolo di germi patogeni tossinfettivi (*Salmonella*, *Vibrio*, *Listeria*). Inoltre, se pur di rado rispetto ai teleostei marini, possono rappresentare ospiti intermedi e/o paratenici di larve di nematodi anisakidi: la patogenicità delle larve di *Anisakis*, sia nella forma invasiva gastrointestinale che nella forma allergica, è ben conosciuta da diversi anni (7). La normativa comunitaria e nazionale nonché recenti note del Ministero della Salute hanno nel contempo evidenziato l'obbligo dell'applicazione delle norme di prevenzione da consumo di prodotti ittici crudi o praticamente crudi (marinati, salati) mediante congelamento a una temperatura non superiore a -20°C per 24 h. E' noto che, negli ultimi anni, la moda del consumo di tali prodotti è andata via via crescendo anche in Italia, in particolare nelle regioni meridionali (4): accanto alle classiche alici marinate, cominciano ad essere proposti anche piatti a base di cefalopodi (polpo marinato a fette, calamaro crudo per sushi). Fra i prodotti del Mar Mediterraneo l'*Anisakis* è stato segnalato in *Todarodes Sagittatus* (2,7), in *Illex coindetii* (6)

ed in un esemplare di seppia (*Sepia officinalis*) pescata nelle acque del Messinese (3). In una nostra precedente indagine avevamo già identificato larve di *Anisakis* in un campione di *Todaropsis eblanae* proveniente dalle coste di Messina (9). In Giappone, dove è comune il consumo di prodotti ittici crudi compresi i cefalopodi, larve di Anisakidae sono state isolate in particolare da totani locali (8): un caso di reazione allergica si è osservato dopo ingestione di cefalopodi crudi salinati (10). Scopo della presente indagine è stato quello di valutare lo stato igienico sanitario di molluschi cefalopodi freschi prelevati presso mercati ittici e/o pescherie, effettuando un esame organolettico (verifica delle condizioni di freschezza del prodotto) e un controllo batteriologico completo (CMT, ricerca di germi alteranti e germi patogeni): inoltre ci è sembrato interessante approfondire il nostro studio sulla ricerca di larve appartenenti al genere *Anisakis* in questa tipologia di prodotti.

MATERIALI E METODI

Nel periodo compreso tra gennaio e dicembre 2010 sono stati esaminati n.50 campioni di molluschi cefalopodi interi freschi di cui 20 di totani (*Todarodes sagittatus*), 12 di seppia (*Sepia officinalis*), 10 di polpo moscardino (*Eledone moscata*), 5 di calamari (*Loligo vulgaris*) e 3 esemplari di polpo (*Octopus vulgaris*) (Tab 1). I campioni sono stati prelevati in alcune pescherie di Palermo e presso il mercato ittico di Sciacca.

Tab 1 Campioni di molluschi cefalopodi esaminati anno 2010

Nome scientifico	Nome comune	Totale esaminati
<i>Todarodes sagittatus</i>	Totano	20
<i>Sepia officinalis</i>	seppia	12
<i>Eledone moscata</i>	Polpo moscardino	10
<i>Loligo vulgaris</i>	calamaro	5
<i>Octopus vulgaris</i>	polpo	3
Totale		50

Una volta pervenuti in laboratorio, trasportati a temperatura di legge, i campioni sono stati sottoposti ad identificazione della specie ittica ed a un esame organolettico, per una valutazione della freschezza del prodotto. Quindi si è proceduto all'esame batteriologico comprendente la Carica Microbica Totale (CMT a 30°C), la ricerca di germi indice di contaminazione o indicatori di qualità (*E.coli*, enterobatteri e coliformi totali), di germi alteranti e di germi patogeni sulla parte muscolare dei campioni prelevata sterilmente: nella parte viscerale è stata effettuata la ricerca di parassiti nematodi. Per la preparazione del campione da sottoporre ad esame microbiologico, è stata seguita la procedura ISO 6887-3:2003 (Microbiology of food and animal feeding

stuffs- Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products). Per la ricerca di *Listeria monocytogenes* e di *Salmonella* spp sono state utilizzate anche metodiche alternative di screening quali immunoenzimatica ELFA e PCR Real Time, entrambe automatizzate su strumentazione da laboratorio (mini VIDAS BioMerieux e Light Cycler ROCHE).

Esame dei caratteri organolettici: per la valutazione dello stato di freschezza sono stati seguiti i criteri indicati dal Regolamento CE 2406/96 che riporta in Allegato I alcune tabelle suddivise per prodotto ittico, compresi i cefalopodi, e viene data una valutazione (in base all'aspetto della pelle, della carne e dell'odore) della categoria di freschezza classificata come "extra", "A" e "B". **Analisi microbiologiche:** CMT a 30°C (ISO 4833:2003); conta di coliformi totali (ISO 4832:2006), enterobatteri (ISO 21528-2:2004), *E.coli* (ISO 16649-2:2001) e stafilococchi c.p.(ISO 6888-1:1999/Amd 1:2003); ricerca di *Pseudomonas* spp (ISO 13720:2010) e di *Vibrio* spp potenzialmente patogeni(ISO/TS 21872-1:2007); ricerca di *L. monocytogenes*: metodo MPN (OM 7/12/1993), metodo VIDAS LMO 2 (AFNOR BIO 12/11-03/04) e Metodo RT-PCR(AOAC 070401: 2004);ricerca di *Salmonella* spp: ISO 6579:2008, metodo VIDAS ICS (AFNOR BIO 12/23-05/07) e Metodo RT-PCR (AOAC 120301: 2003). I ceppi isolati sono stati sottoposti ad identificazione biochimica con gallerie del commercio (API 20NE, API 20 E BioMerieux). **Ricerca Anisakidae:** i campioni di molluschi sono stati aperti tramite bisturi sterile per evidenziare la parte viscerale e lo stomaco: i visceri sono stati asportati e osservati sia visivamente (Reg 2074/2004) che mediante l'ausilio dello stereomicroscopio. I nematodi riscontrati sono stati isolati, puliti in soluzione fisiologica e fissati con etanolo 70%; successivamente le larve sono state poste su vetrino e chiarificate in glicerolo per l'esame morfologico tramite microscopico ottico. Le larve identificate come *Anisakis* spp sono state conservate in etanolo 70% per la successiva identificazione biomolecolare (PCR-RFLP). La procedura di identificazione morfologica e molecolare è descritta in un nostro precedente lavoro (9).

RISULTATI

Nella Tab 2 vengono riportati i risultati microbiologici divisi per parametro e per tipologia di campione. Riguardo alla CMT a 30°C sono stati ottenuti valori compresi tra 4.0×10^4 - 8.8×10^5 : valori di CMT $> 10^5$ sono stati osservati in 2 campioni di polpo moscardino e 1 campione di calamaro in cui sono stati riscontrati enterobatteri $> 10^3$ (identificati come *Enterobacter cloacae*). Negli stessi campioni sono stati isolati germi responsabili di alterazioni negli alimenti quali *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P.luteola*: l'esame organolettico aveva permesso di classificarli come categoria "B". Non sono stati isolati ceppi di *Salmonella* spp né di *Listeria monocytogenes* ed il conteggio di *E. coli* e di stafilococchi cp è risultato $< 1 \times 10^1$ ufc/g. Sui campioni pervenuti è stata effettuata anche la ricerca di *Vibrio* spp, potenzialmente patogeni quali *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, microrganismi attualmente non inseriti nei Reg comunitari sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari. Nella nostra indagine abbiamo isolato *Vibrio alginolyticus*, ceppo di frequente riscontro nei prodotti ittici, il cui ruolo come agente di gastroenteriti è attualmente in studio. *V. metschnikovii* è stato isolato in un campione di seppia ed un campione di calamaro: negativa la ricerca di *Vibrio* quali *V. parahaemolyticus*.

Tab 2 valori di CMT e microrganismi isolati nei campioni esaminati

Nome scientifico	Nome comune	CMT 30°C	Enterobatteri totali	<i>Pseudomonas/Vibrio</i> spp
<i>Eledone moscata</i>	Polpo moscardino	1.2×10^5	$< 1 \times 10^1$	<i>P. aeruginosa</i>
<i>Eledone moscata</i>	Polpo moscardino	4.5×10^5	4.5×10^3 (<i>Enterob cloacae</i>)	<i>P. fluorescens</i>
<i>Eledone moscata</i>	Polpo moscardino	6.3×10^5	4.4×10^3 (<i>Enterob cloacae</i>)	<i>P. aeruginosa</i>
<i>Loligo vulgaris</i>	calamaro	1.8×10^5	6.7×10^3 (<i>Enterob cloacae</i>)	<i>P. luteola</i> <i>V. metschnikovii</i>
<i>Sepia officinalis</i>	seppia	8.8×10^5		<i>V. metschnikovii</i>

In riferimento alle indagine per la ricerca di nematodi Anisakidae, in un campione di totano, prelevato presso il mercato ittico di Sciacca, è stata isolata 1 larva di *Anisakis* e 3 larve riferibili morfologicamente al genere *Hysterothylacium* (coinfestazione) in cavità viscerale; un altro totano della stessa partita presentava solo larve riferibili a questo genere (Tab 3). La larva di *Anisakis* isolata è stata identificata morfologicamente come *Anisakis* Tipo I (*sensu* Berland); l'identificazione molecolare di specie (PCR-RFLP), ha permesso di identificarla come *Anisakis pegreffii*. La stessa specie è stata identificata in totani della Tunisia (2)

Tab 3 Risultati della ricerca di Anisakidae

Nome scientifico	Nome comune	esaminati	Presenza Anisakidae
<i>Todarodes sagittatus</i>	Totano	20	1 <i>Anisakis</i> Tipo I 2 <i>Hysterothylacium</i>
<i>Sepia officinalis</i>	seppia	12	-
<i>Eledone moscata</i>	Polpo moscardino	10	-
<i>Loligo vulgaris</i>	calamaro	5	-
<i>Octopus vulgaris</i>	polpo	3	-

CONCLUSIONI

L'indagine da noi effettuata, seppure su un numero limitato di campioni in cui non sono tuttavia stati rilevati rischi sanitari, ci permette di fare alcune considerazioni anche in riferimento alle modalità di lavorazione e conservazione dei prodotti della pesca freschi esaminati. E' stato notato che presso gli esercenti i prodotti della pesca erano spesso tenuti in condizioni igienico sanitarie precarie e non conservati e trasportati alle T imposte dall'attuale legislazione (ghiaccio fondente). Tale controllo, tenuto conto anche delle nostre temperature ambientali, non deve quindi essere sottovalutato: i molluschi cefalopodi come tutti i prodotti della pesca freschi sono altamente deperibili per cui è importante il controllo lungo la filiera, soprattutto al commercio, per garantire

un prodotto salubre per il consumatore in particolare per un'eventuale consumo crudo. Riguardo il riscontro di *Anisakis* in un campione di totano, il nostro risultato è supportato dai diversi dati bibliografici che mostrano una bassa prevalenza di *Anisakis* in molluschi cefalopodi. Alla luce di quanto osservato riteniamo comunque interessante approfondire l'eventuale infestazione nei diversi organismi acquatici d'interesse alimentare quali i cefalopodi. Non si deve comunque sottovalutare l'eventuale rischio per il consumatore sia perché i cefalopodi possono essere anche consumati freschi allo stato crudo in diverse Regioni compresa la nostra, sia perché la parassitosi nei cefalopodi potrebbe sfuggire ai controlli ispettivi.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Crostacei e Molluschi cefalopodi Studio di mercato. Camera di Commercio Cagliari - Camera di Commercio Oristano BMTI Ed 2011
- 2) Farjallah S., Slimane B.B., Busi M., Paggi L., Amor N., Blel H., Said K., D'Amelio S. (2008) Occurrence and molecular identification of *Anisakis* spp from the North African coasts of Mediterranean Sea *Parasitol Res* 102(3); 371-9
- 3) Giuffrida A., Ziino G., Pennisi L. (2002) Larva *Anisakis* in *Sepia officinalis* del Mediterraneo (Sicilia) *Industrie Alimentari Vol 41*; 1086-88
- 4) Normanno G., D'Ambrosio A., Quaglia NC., Celano GV , Parisi A. (2003) Considerazioni igienico-sanitarie su prodotti ittici consumati crudi *Industrie Alimentari XLII*; 961-964
- 5) Palese L., Palese A. Il controllo sanitario e qualitativo dei prodotti alimentari della pesca Vol I Ed Piccin 1991
- 6) Petric M., Mladineo I., Sifer SK (2011) Insight into the short-finned squid *Illex coindetii* (Cephalopoda: Ommastrephidae) feeding ecology: is there a link between helminth parasites and food composition? *J Parasitol* 97(1):55-62
- 7) Pozio E. (2005) Zoonosi parassitarie trasmesse da prodotti ittici *Rapp. ISTISAN*, 05/24; 38-48
- 8) Nagasawa K., Moravec F. (1995) Larval anisakid nematodes of Japanese common squid (*Todarodes pacificus*) from the Sea of Japan *J Parasitol* 81(1):69-75
- 9) Sciortino S., Palumbo P., Reale S., Macrì D., Costa A. (2009) "Applicazione della PCR-RFLP per l'identificazione di specie di larve di *Anisakis* isolate da prodotti della pesca" *Atti S.I.Di.L.V.2009*: 66-67
- 10) Shigehira Y., Inomata N., Nakagawara R., Okawa T., Sawaki H., Nakamura K (2010) A case of an allergic reaction due to *Anisakis simplex* after the ingestion of salted fish guts made of *Sagittated calamari*: allergen analysis with recombinant and purified anisakis simplex allergens *Arerugi* 2010; 59(1):55-60

"Ricerca Corrente IZS SI 11/07 Ministero della Salute"

PCR-SSCP PER L'IDENTIFICAZIONE DI *PROTOTHECA ZOPFII* GENOTIPO 2 ISOLATE DA CAMPIONI DI LATTE BOVINO

Cremonesi P.¹ & Chessa S.¹, Ricchi M.², Pozzi F.³, Castiglioni B.¹, Luini M.³

¹IBBA – CNR, Lodi; ²IZSLER - Sezione di Piacenza; ³IZSLER - Sezione di Lodi

Key Words: *Prototheca* spp., mastite, SSCP

INTRODUZIONE

Dopo la prima descrizione (1) di mastite bovina causata dall'alga unicellulare *Prototheca zopfii* e successive sporadiche segnalazioni, recentemente si è assistito in varie parti del mondo ad un incremento dell'incidenza di mastite bovina causata da quest'alga (6, 8). Le mastiti dovute a *Prototheca zopfii* sono un grave problema per l'allevamento poiché tali infezioni raramente sono associate a segni clinici evidenti ma determinano un rialzo delle cellule somatiche del latte e presentano una limitata o del tutto assente risposta alla maggior parte dei trattamenti sanitari (7). Le specie patogene, sino ad ora riconosciute, sono quattro: *Prototheca zopfii* genotipo 2, *Prototheca blaschkeae*, *Prototheca cutis* e *Prototheca wickerhamii*. Le altre specie (*Prototheca ulmea* e *Prototheca stagnora*), così come il genotipo 1 di *Prototheca zopfii* sono considerate saprofiti ambientali (7, 9, 10). Gli studi condotti sino ad ora mostrano una netta prevalenza di *Prototheca zopfii* genotipo 2 nell'eziologia della mastite bovina, mentre *Prototheca blaschkeae* è stata isolata solo sporadicamente (4, 7).

La tecnica PCR-SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism), utilizzata finora con successo per l'analisi di diversi geni nell'uomo e in molte specie animali e batteriche (5), permette di evidenziare fino all'80% delle mutazioni puntiformi del tratto di DNA in esame. Le mutazioni dovute a sostituzione nucleotidica provocano un polimorfismo della conformazione che il singolo filamento di DNA assume quando la doppia elica è sottoposta a denaturazione e che è determinato da un differente appaiamento intramolecolare delle basi. A questa diversa conformazione coincide una differente velocità di migrazione durante corsa elettroforetica in un gel di poliaccrilammide verticale.

Il presente lavoro descrive l'uso della tecnica PCR-SSCP per distinguere *Prototheca zopfii* genotipo 1, *Prototheca zopfii* genotipo 2 e *Prototheca blaschkeae* in ceppi isolati da campioni di latte mastitico.

MATERIALI E METODI

Campioni - L'approccio metodologico è stato ottimizzato utilizzando sia ceppi di collezione di *Prototheca* spp. (*Prototheca zopfii* genotipo 1, IZSLER 308527; *Prototheca zopfii* genotipo 2, IZSLER 219509; *Prototheca blaschkeae*, IZSLER 161681) sia 15 ceppi di *Prototheca* spp. isolati da 9 campioni di latte di massa e da 6 campioni di latte mastitico di singola bovina provenienti da diversi allevamenti della provincia di Lodi.

Gli isolati e i ceppi di collezione sono stati fatti crescere su piastre Sabouraud agar e in BHI agar mediante incubazione a 37°C per 48 ore.

Estrazione - Le cellule di *Prototheca* spp. sono state risospese in 50 µl di acqua distillata e, dopo sonicazione, il DNA è stato estratto dalle cellule dell'alga utilizzando il Kit PowerPlant® DNA Isolation (Mo Bio Laboratories, Inc.) seguendo il protocollo descritto dal fornitore. Contemporaneamente, dopo opportune modifiche, è stata utilizzata una procedura precedentemente

descritta in letteratura (2) ed ottimizzata per l'estrazione del DNA batterico direttamente da campioni di latte. Il protocollo modificato è stato testato sia sugli isolati sia direttamente sui campioni di latte mastitico. Il DNA ottenuto è stato qualitativamente analizzato mediante Nanodrop®.

PCR - I primer utilizzati in questo studio sono stati disegnati in due regioni del gene 18S rRNA mediante il programma Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) ottenendo due amplificati di ampiezza pari a 313 bp e 290 bp. Il ciclo di amplificazione prevedeva una denaturazione iniziale a 94°C per 5 minuti seguita da 30 cicli di 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 56°C e 1 minuto a 72°C, con un'estensione finale a 72°C per 7 minuti. Le reazioni di amplificazione venivano condotte in un volume finale di 25 µl contenente ~ 30 ng di DNA, 12,5 µl di 2X PCR Master Mix (Fermentas, M-Medical) e 0,8 µM dei primer forward e reverse.

PCR-SSCP

L'analisi dei frammenti amplificati è stata effettuata mediante l'impiego della tecnica SSCP utilizzando un gel al 10% di concentrazione, con rapporto acrilammide:bisacrilammide di 37,5:1 in 0,5X Tris-borate EDTA (TBE). La corsa è stata fatta a 220 V e a temperatura di 9°C, per 15 ore.

Al termine della corsa elettroforetica i diversi *pattern* di migrazione sono stati rilevati dopo colorazione con nitrato d'argento, scelta in virtù della sua sensibilità.

RISULTATI

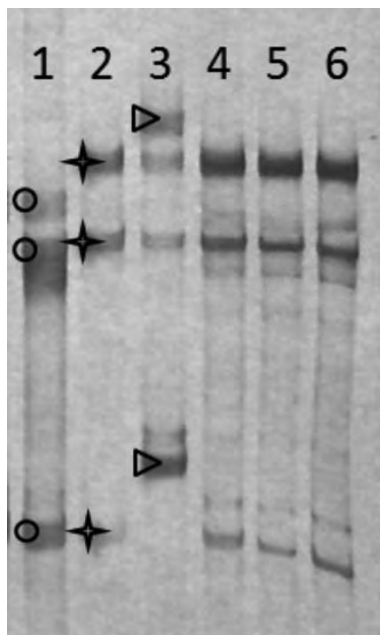
Estrazione - Dal confronto dei risultati ottenuti tra il KIT PowerPlant® DNA Isolation e il protocollo di estrazione da latte opportunamente modificato, è emersa una maggior resa nell'estrazione del DNA di *Prototheca* spp. mediante quest'ultimo (60 ± 15 ng/µl per il protocollo modificato rispetto a 25 ± 10 ng/µl per il KIT PowerPlant® DNA Isolation). I valori di assorbanza ($A_{260/280}$) relativi alla qualità del materiale estratto hanno mostrato, per entrambe le procedure utilizzate, valori compresi tra 1,55 e 1,77.

PCR-SSCP - L'analisi simultanea di due regioni del gene 18S rRNA di 313 e 290 bp mediante PCR-SSCP ha permesso di identificare tre diversi *pattern* di migrazione. Il primo, a maggiore mobilità elettroforetica, è dato dalla *Prototheca zopfii* genotipo 1; il secondo, a mobilità elettroforetica intermedia, è dato dalla *Prototheca zopfii* genotipo 2; infine il terzo, a minore mobilità elettroforetica, è dato da *Prototheca blaschkeae* (Figura 1).

Tutti i campioni isolati da latte di massa o da latte mastitico di singola bovina provenienti da diversi allevamenti della provincia di Lodi hanno dato lo stesso *pattern* di migrazione, corrispondente al *pattern* di migrazione intermedio, ovvero quello dato da *Prototheca zopfii* genotipo 2. Tre di questi campioni sono stati anche sottoposti a sequenziamento nucleotidico per verificare che corrispondessero effettivamente alla *Prototheca zopfii* genotipo 2.

L'analisi degli elettroferogrammi e il confronto con le sequenze depositate in banca dati hanno attestato la corrispondenza fra il *pattern* osservato e la *Prototheca zopfii* genotipo 2 confermando il risultato ottenuto con la tecnica PCR-SSCP.

Figura 1: Analisi simultanea di due regioni del gene 18S rRNA di 313 e 290 bp mediante PCR-SSCP. 1=Prototheca zopfii genotipo 1; 2=Prototheca zopfii genotipo 2; 3=Prototheca blaschkeae; 4-6=ceppi di Prototheca spp. isolati da latte di massa provenienti da allevamenti con mastiti contagiose.



DISCUSSIONE

Hayashi (1991) ha stimato la sensibilità della metodica PCR-SSCP come probabilità di individuare una mutazione puntiforme, trovando valori del 99% per frammenti da 100 a 300 bp e dell'89% per frammenti da 300 a 450 bp. Per questo motivo basandosi sulle sequenze disponibili in banca dati si è scelto di disegnare due coppie di primer che amplificassero due frammenti di dimensioni ridotte che includessero regioni contenenti i polimorfismi noti nelle tre specie.

La PCR-SSCP è un metodo riproducibile, veloce e molto semplice per la rilevazione di SNP (Single Nucleotide Polymorphism), delezioni/inserzioni e riarrangiamenti del DNA amplificato. Questo metodo è stato utilizzato con successo per l'analisi di diversi geni nell'uomo, in specie animali e batteriche (5), ma la tecnica non è mai stata utilizzata fino ad ora per l'analisi di queste alghe unicellulari. I ben distinti *pattern* di migrazione ottenuti dimostrano che le differenze osservate a livello genico sono sufficienti a discriminare efficacemente le tre specie.

L'approccio molecolare impiegato si è dimostrato, anche in questo caso, una tecnica di grande utilità per analizzare in modo rapido ed economico una variabilità genetica di queste specie.

L'analisi di campioni di campo conferma gli studi condotti in precedenza, che mostrano chiaramente la prevalenza di *Prototheca zopfii* genotipo 2 nell'eziologia della mastite bovina. Un ampliamento della campionatura è necessario per confermare tale risultato.

Requisito fondamentale per lo studio a livello molecolare della variabilità genetica è l'ottenimento di un DNA con buone caratteristiche in termini di quantità e qualità. In quest'ottica

si è inserito il confronto di diversi metodi di estrazione del DNA. Il protocollo modificato utilizzato in questo studio ha consentito di ottenere un DNA qualitativamente confrontabile ma quantitativamente superiore ai kit commerciali; inoltre tale protocollo è applicabile direttamente al campione di latte e non richiede pre-trattamento del campione né isolamento in coltura delle alghe.

ABSTRACT

We report the development of PCR-SSCP (PCR-Single Strand Conformational Polymorphism) to identify *Prototheca* spp., responsible for bovine mastitis: *Prototheca zopfii* (both genotypes) and *Prototheca blaschkeae*. The method was developed using reference strains belonging to *Prototheca zopfii* genotype 1, *Prototheca zopfii* genotype 2 and *Prototheca blaschkeae*. The assay was applied to 15 isolates of *Prototheca* spp. isolated from bovine mastitic milk or bulk tank milk samples, all identified as *Prototheca zopfii* genotype 2. We conclude that the described PCR-SSCP approach is accurate, inexpensive and highly suitable for the identification of *Prototheca zopfii* genotype 2 on field isolates but also directly on milk, if preceded by a specific DNA extraction method.

BIBLIOGRAFIA

1. Blaschke-Hellmessen R, Schuster H, and Bergmann V (1985): Differenzierung von Varianten bei *Prototheca zopfii* (Krüger 1894). Arch. Exp. Veterinärmed., 39: 387-397.
2. Cremonesi P, Castiglioni B, Malferrari G, Biunno I, Vimercati C, Moroni P, Morandi S, and Luzzana M (2006): Technical note: Improved method for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk. J. Dairy Sci., 89(1): 163-169.
3. Hayashi K (1991): PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. PCR methods and applications 1: 34-38.
4. Kishimoto Y, Kano R, Maruyama H, Onozaki M, Makimura K, Ito T, Matsubara K, Hasegawa A, and Kamata H (2010): 26S rDNA-Based phylogenetic investigation of Japanese cattle-associated *Prototheca zopfii* isolates. J. Vet. Med. Sci., 72(1): 123-126.
5. Küpper J, Chessa S, Rignanese D, Caroli A, and Erhardt G (2010): Divergence at the casein haplotypes in dairy and meat goat breeds. J. Dairy Res., 77: 56-62.
6. Osumi T, Kishimoto Y, Kano R, Maruyama H, Onozaki M, Makimura K, Ito T, Matsubara K et al. (2008): *Prototheca zopfii* genotypes isolated from cow barns and bovine mastitis in Japan. Vet. Microbiol., 131: 419-423.
7. Ricchi M, Cammi G, Garbarino CA, Buzzini P, Belletti GL, and Arrigoni N (2010): A rapid real-time PCR/DNA resolution melting method to identify *Prototheca* species. J. Appl. Microbiol., 110(1): 27-34.
8. Roesler U, and Hensel A (2003): Longitudinal analysis of *Prototheca zopfii*-specific immune responses: correlation with disease progression and carriage in dairy cows. J. Clin. Microbiol., 41: 1181-1186.
9. Roesler U, Moller A, Hensel A, Baumann D, and Truyen U (2006): Diversity within the current algal species *Prototheca zopfii*: a proposal for two *Prototheca zopfii* genotypes and description of a novel species, *Prototheca blaschkeae* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 56: 1419-1425.
10. Satoh K, Ooe K, Nagayama H, and Makimura K (2010): *Prototheca cutis* sp. nov., a newly discovered pathogen of protothecosis isolated from inflamed human skin. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 60(Pt 5): 1236-1240.

INDAGINE PRELIMINARE SULLA DIFFUSIONE DI CEPPI DI PASTEURELLA SPP. E MANNHEIMIA HAEMOLYTICA IN SICILIA

Curro V., Marineo S., Galuppo L., Piraino C., Lipari L. & Caracappa S.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri" Palermo, Italy

Keywords: *Pasteurella* spp., epidemiologia.

SUMMARY

Members of the family *Pasteurellaceae* are microorganisms ranging from pathogen to commensal of animal and human mucosa. *M. haemolytica* is an important mastitis causal agent. In this study we report our preliminary results concerning the identification of bacteria belonging to the *Pasteurellaceae* family from different matrices in Sicily during 2010. This result are the starting point for a genotyping project aimed to carry out an epidemiological study of these important bacteria.

INTRODUZIONE

La famiglia delle *Pasteurellaceae* comprende numerosi generi di batteri Gram negativi commensali, opportunisti e patogeni come *Pasteurella*, *Mannheimia* e *Haemophilus*.

Gli organi bersaglio principali sono riconducibili all'apparato respiratorio e mammario. *Pasteurella multocida*, ad esempio, risiede normalmente nel tratto respiratorio superiore di animali sani.

Il suo coinvolgimento, come agente eziologico della sindrome respiratoria bovina, è in aumento a causa, della continua evoluzione del management aziendale e dell'utilizzo sempre più pressante di vaccini contro altri patogeni dell'apparato respiratorio. Non è del tutto chiaro se la malattia sia dovuta a fattori di rischio che rendono la flora autoctona in grado di sopraffare il sistema immunitario o alla diffusione di ceppi virulenti (2).

Proprio a causa del normale habitat di questi microrganismi è stato postulato il trasferimento dalla bocca o dal naso-faringe ai dotti galattofori (1). Membri appartenenti alla famiglia delle *Pasteurellaceae* possono causare mastiti cliniche e subcliniche (3).

Lo scopo di questo studio mira a rilevare la reale circolazione di agenti ascrivibili alla famiglia *Pasteurellaceae* nel territorio della regione Sicilia. A tal fine sono stati esaminati prevalentemente campioni provenienti da allevamenti bovini e ovini con problemi a carico dell'apparato respiratorio e mammario, ma abbiamo voluto inserire nel presente studio anche alcuni campioni appartenenti ad altre specie animali.

MATERIALI E METODI

I campioni prelevati provenivano principalmente da ruminanti da reddito ma sono stati inseriti anche altri conferimenti pervenuti routinariamente presso i nostri laboratori. Campioni di latte provenivano da allevamenti con patologie riferibili a mastiti.

Tutti i campioni sono accettati e conferiti presso il laboratorio, in opportuni contenitori a temperatura controllata e processati nel più breve tempo possibile. Gli isolamenti sono stati effettuati secondo le procedure in uso presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia (246 Accredia).

RISULTATI

I risultati riportati si riferiscono a campioni pervenuti nel 2010.

I batteri appartenenti a questa famiglia sono cocco bacili o bacilli aerobi anaerobi facoltativi, immobili. Le caratteristiche biochimiche più importanti di questo genere sono riassunte in tab. 1.

Test biochimico	Reazione
Catalasi	+ ¹
Ossidasi	+ ²
Crescita su terreno Mc Conkey	-
β-emolisi	- ³

Tab 1 Caratteristiche principali delle *Pasteurellaceae*. 1: *P. trehalosi* è catalasi negativa; 2: solo una specie, *P. bettaye*, è ossidasi positiva; 3: ad eccezione di *M. haemolytica*.

In fig. 1 è illustrata la distribuzione degli organi da cui sono stati isolati membri appartenenti alla famiglia delle *Pasteurellaceae*. Come è possibile vedere il latte e i polmoni sono le matrici da cui è stata più frequente l'isolamento, sebbene altri organi, non direttamente correlati con il normale habitat di questi microrganismi, possono essere colonizzati.

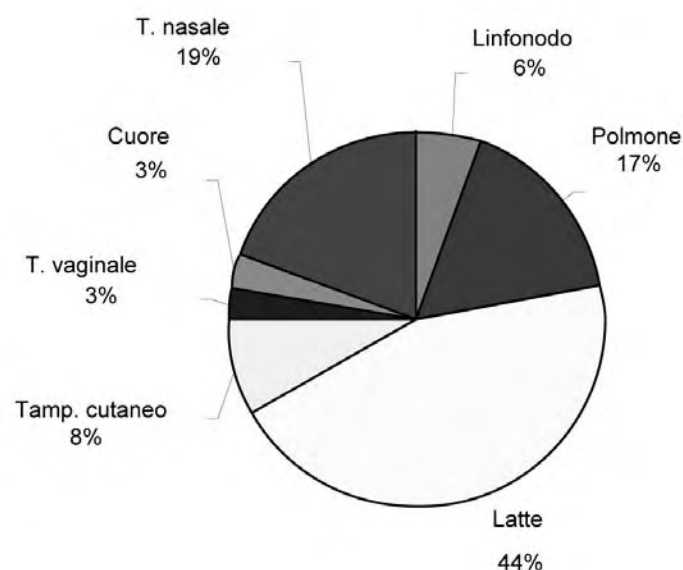
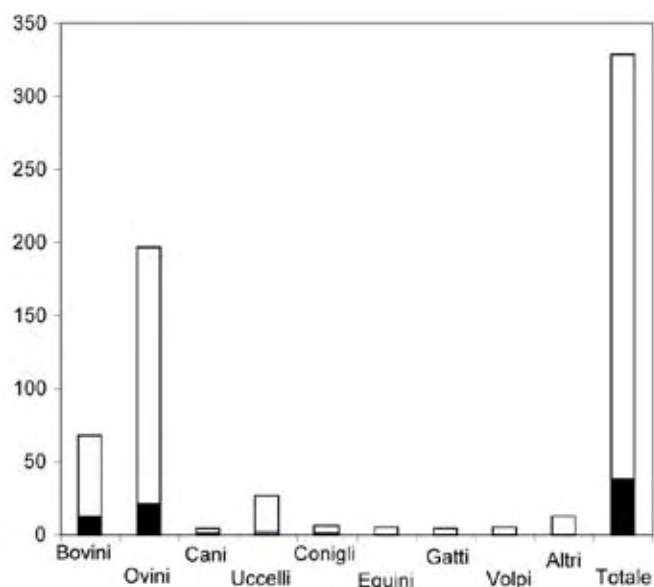


Fig. 1 Percentuali di isolamento di *Pasteurellaceae* da campioni biologici pervenuti presso l'Istituto Zooprofilattico della Sicilia nel 2010

In fig. 2 si vuole evidenziare la distribuzione tra le varie specie animali prese in esame. Come è possibile vedere ovini e bovini mostrano una maggiore percentuale di positività.

Fig. 2 Distribuzione delle specie animali analizzate. In bianco sono indicati il numero degli animali analizzati e in nero i positivi.



In tab. 2 sono riassunti gli esami eseguiti, quelli positivi e il numero di allevamenti presi in considerazione in questo studio in particolare per i campioni e le specie principali.

	Polmoni			Latte		
	Allevamenti	Eseguiti	Positivi	Allevamenti	Eseguiti	Positivi
Bovini	18	54	9	1	1	1
Ovini	15	16	6	25	160	15

Tab.2 Distribuzione degli esami effettuati sui campioni di latte e sui polmoni in bovini e ovini

Il 20% dei ceppi isolati è stato identificato come *Mannheimia haemolytica* ritrovata in ovini per i quali costituisce un'importante causa di mastite.

DISCUSSIONE

La famiglia delle *Pasteurellaceae* ospita batteri commensali e patogeni opportunisti che costituiscono un problema sanitario alla corretta conduzione aziendale per gli animali. L'aumento del numero di isolamenti di questi microrganismi negli ultimi anni ha richiesto una maggiore attenzione nei loro confronti. Studiare la diffusione dei ceppi appartenenti alla famiglia delle *Pasteurellaceae* costituisce il primo passo per uno studio epidemiologico mirato alle dinamiche di circolazione e alla circoscrizione di agenti causa di patologie nell'apparato respiratorio e mammario. Esistono diverse tecniche molecolari (RAPD, PFGE, MLST) in grado di distinguere genotipicamente i vari ceppi. La successiva genotipizzazione dei ceppi isolati ci consentirà lo studio delle dinamiche di trasmissione a livello regionale e di allevamento. Infatti la tipizzazione rende possibile anche una valutazione della qualità del management dell'allevamento, poiché discriminare i ceppi causa di infezione permette di capire se le infezioni sono dovute allo stesso microrganismo non completamente eradicato o a infezione da parte di nuovi ceppi batterici.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Fragkou I.A., D.A. Gougoulis, C. Billinis, V.S. Mavrogianni, M.J. Bushnell, P.J. Cripps, A. Tzora, G.C. Fthenakis (2011) Transmission of *Mannheimia haemolytica* from the tonsils of lambs to the teat of ewes during sucking *Veterinary Microbiology*, Volume 148: 66-74
1. Hotchkiss E.J., J.C. Hodgson, E. Schmitt-van de Leemput, M.P. Dagleish, R.N. Zadoks (2011) Molecular epidemiology of *Pasteurella multocida* in dairy and beef calves *Veterinary Microbiology*, Volume 151(3-4):329-335
- Omaleki L., G. F. Browning, J. L. Allen, S. R. Barber (2011) The role of *Mannheimia* species in ovine mastitis *Veterinary Microbiology*, Volume 153(1-2):67-72

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano R. Calato e G. Graziano per l'assistenza tecnica

QUALE ATTENZIONE NEI CONFRONTI DEL CONSUMATORE ALLERGICO IN REGIONE PIEMONTE?

D'Errico V.¹, Vitale N.¹, Parisani V.¹, Fragassi S.², Bianchi D. M.², Gallina S.², Decastelli L.², Chiavacci L.¹, Barbaro A.¹

¹S.S. Osservatorio Epidemiologico, Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino;

²S.C. Controllo Alimenti e Igiene delle Produzioni, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

Parole chiave: allergeni, ovoproteine, proteine del latte

Key words: food allergens, egg proteins, milk proteins

SUMMARY

Allergies are an important health issue as each year people with allergic reactions to food are estimated to be about one million. Undeclared allergens in food label represent a risk for consumers. According to Directive 2003/89/EC declaration of all ingredients and derived substances in the label is mandatory.

To protect food-allergic consumers, a monitoring plan on allergenic ingredients in foodstuffs was settled in the Piedmont (north-western Italy) in 2007-2010. The aim of this work is to analyze 4 years data in order to assess the presence of milk and egg allergenic proteins not declared on label in food placed on the market checking the compliance of labeling of food allergens. Analyses have been carried out with ELISA tests, both for the detection of the egg-proteins and the detection of milk protein. β -lactoglobulin has been found out in 3,8% (34/899) of samples while egg-proteins in 3,8% (32/850).

INTRODUZIONE

La presenza degli allergeni negli alimenti è diventato un argomento che ha assunto sempre più rilevanza negli ultimi anni in quanto è aumentata la percentuale di consumatori allergici che costituiscono sul totale della popolazione il 2% degli adulti e il 5% dei bambini (1).

Gli allergeni non dichiarati in etichetta, se presenti anche solo in tracce, possono causare una severa reazione avversa, a volte con esito fatale.

La Commissione Europea ha emanato la Direttiva 2003/89/CE, recepita in Italia con il D.lgs. 114/2006 con l'obiettivo di garantire ai cittadini, soprattutto a quelli con sensibilità nota a componenti od additivi alimentari, il diritto ad un'informazione più approfondita sul contenuto degli alimenti rendendo obbligatoria in etichetta la dichiarazione delle sostanze considerate allergizzanti (2,3).

Secondo la normativa entrata in vigore, tali sostanze sono: cereali contenenti glutine, crostacei, uova e prodotti derivati, pesce, arachidi, soia, latte, frutta a guscio, sedano, senape, semi di sesamo, anidride solforosa e solfiti in concentrazioni superiori a 10 mg/kg o 10 mg/l espressi come SO₂.

La lista è stata integrata dalla direttiva 2006/142/CE, che ha aggiunto l'obbligo di indicare in etichetta anche lupino e molluschi.

Per la tutela dei consumatori e per monitorare l'eventuale presenza di non conformità delle etichette, nella Regione Piemonte a partire dall'anno 2007, è stato emanato un Piano di Monitoraggio per la ricerca di allergeni negli alimenti.

Il piano prevede il prelievo, da parte dei Servizi Veterinari delle ASL competenti sul territorio regionale, di campioni di prodotti a base di carne, preparazioni di carni ed altri alimenti (principalmente alimenti per l'infanzia e sughi pronti) finalizzato alla ricerca dei seguenti allergeni: ovoproteine e β -lattoglobuline. Il criterio di selezione per la scelta del campione da prelevare è l'assenza in etichetta di indicazioni relative alla presenza di allergeni.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati i dati estratti dal sistema informatico dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta e relativi ai campioni esaminati da gennaio 2007 a dicembre 2010 presso il Laboratorio Controllo Alimenti della sede di Torino. Le metodiche utilizzate sono riportate in tabella 1.

Tabella 1 - Metodiche utilizzate

Allergene	Metodica	Limite di rilevazione
β -lattoglobuline	ELISA RIDASCREEN	0,2 ppm
ovoproteine	ELISA RIDASCREEN FAST	0,6 ppm

Per la ricerca di β -lattoglobuline è stato utilizzato il kit ELISA RIDASCREEN β -lactoglobulin (R - Biopharm Italia Srl); per la ricerca di proteine delle uova è stato impiegato il kit ELISA RIDASCREEN FAST Ei/Egg Protein (R - Biopharm Italia Srl).

Entrambi i kit si basano sulle stesse procedure analitiche: 1 g di campione viene omogenizzato tramite Stomaker® con 20 mL di buffer di estrazione fornito dal kit in Stomaker®. Si procede, quindi, all'incubazione per 10' a 60°C e successivamente alla filtrazione su filtro di nitrocellulosa. Un'aliquota di 50 μ L del surnatante è testata con ciascun kit ELISA. La lettura si effettua allo spettrofotometro a 450 nm e dall'assorbanza viene calcolata la concentrazione del campione secondo la legge di Lambert – Beer.

Il limite di rilevabilità per il kit ELISA RIDASCREEN β -lactoglobulin è 0,2 mg/kg; per il kit ELISA RIDASCREEN FAST Ei/Egg Protein è di 0,6 mg/kg.

Per valutare l'associazione tra non conformità e tipologia di prodotti è stata eseguita una analisi bivariata con il test chi quadro.

RISULTATI

Nel periodo dal 2007 al 2010 sono state effettuate 899 analisi per la ricerca di β -lattoglobuline ed 850 per ovoproteine per un totale complessivo di 1749 analisi. Le analisi per β -lattoglobuline hanno evidenziato 34 campioni non conformi su 899 (3,8%; IC 95%: 2,5%-5,03%) controllati; 18 sono preparazioni a base di carne (salsicce, hamburger, polpette), 13 prodotti a base di carne (tra cui prosciutto cotto, wurstel, salame), 3 altri prodotti (2 carni macinate di bovino, 1 wafer) (Tabella 1).

Per quanto riguarda i campioni controllati per ovoproteine (N=850) 32 sono risultati non conformi (3,8%; IC 95%: 2,5%-5,04%); di questi 27 sono preparazioni a base di carne (di cui 17 hamburger), 4 sono prodotti a base di carne (salame e wurstel) e 1 altro prodotto (carne macinata di bovino) (Tabella 2).

Tabella 1 – Campioni analizzati per β -lattoglobuline

categoria alimento	N. campioni analizzati per β -lattoglobuline	N. campioni non conformi	% campioni non conformi
Preparazioni di carni	450	18	4,0
Prodotti a base di carne	398	13	3,3
Altri prodotti	51	3	5,9
Totale	899	34	3,8

Tabella 2 – Campioni analizzati per ovoproteine

categoria alimento	N. campioni analizzati per ovoproteine	N. campioni non conformi	% campioni non conformi
Preparazioni di carni	454	27	6,0
Prodotti a base di carne	336	4	1,2
Altri prodotti	60	1	1,6
Totale	850	32	3,8

L'analisi statistica bivariata ha mostrato associazione tra la presenza di allergeni e tipologia di alimento ($\chi^2=7.9$; $p<0.01$); in particolare le ovoproteine hanno una probabilità di quasi 5 volte superiore (OR=4.95; IC95%: 1.89-12.97) di essere rilevate nelle preparazioni di carni rispetto alle altre tipologie di alimento.

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti confermano l'importanza dei piani di monitoraggio: infatti, se correttamente strutturati e applicati consentono di valutare il grado di rischio per il consumatore allergico e di verificare il rispetto della normativa comunitaria per l'etichettatura dei prodotti alimentari.

Le sostanze allergizzanti oggetto di questo studio possono essere impiegate sia come ingredienti che come coadiuvanti tecnologici nell'industria alimentare; quando si utilizza la medesima linea di produzione per diverse tipologie di alimenti, può verificarsi la cross-contaminazione di prodotti nei quali gli allergeni non sono previsti.

Come evidenziato dai risultati del presente lavoro inoltre, gli allergeni sono stati riscontrati in maggior numero nelle preparazioni a base di carne, che essendo più soggette a manipolazione, possono più facilmente essere esposte ad una contaminazione accidentale.

E' da sottolineare in particolare che il soggetto allergico che consuma una preparazione a base di carne è esposto ad un rischio 5 volte superiore di assumere un alimento contaminato da proteine delle uova rispetto al consumo di un prodotto a base di carne.

I nostri risultati invitano ad una convergenza operativa tra Autorità di Controllo e Operatori del Settore Alimentare finalizzata a una maggiore tutela del consumatore allergico.

Rimane evidente che la puntuale informazione del consumatore allergico, attraverso la corretta etichettatura da parte delle aziende produttrici è senza dubbio uno degli strumenti migliori per un elevato grado di sicurezza.

BIBLIOGRAFIA

1. Molkhou P. (2005). Epidemiology of food allergies. Rev. Infir. 111, 24-27
2. Campisi G. and Di Liberto C. (2003). Food allergy in oral medicine. A review of the literature. Minerva Stomatol. 52 (7-8), 351-363.
3. Moneret-Vautrin DA. and Morisset M. (2005). Adult food allergy. Curr. Allergy Asthma Rep. 5 (1), 80-854.

MESSA A PUNTO DI METODICA PCR PER LA DIAGNOSI EZIOLOGICA DI ENCEFALITOZONOSI DEL CONIGLIO

¹De Nadai V., ¹Daminelli P., ¹Maccabiani G., ¹Zanardini N., ²Lavazza A.

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Reparto di Microbiologia, Brescia;

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Reparto di Virologia, Brescia

Key words: *E. cuniculi*, PCR, diagnosi

SUMMARY

Encephalitozoonosis is a chronic protozoan disease affecting several species of mammals, including lagomorphs and rodents. Despite many studies and surveys it remains a difficult disease to diagnose with certainty especially *in vitam*. The aim of the study was to validate a PCR method for the detection of *E. cuniculi* in rabbit kidney. Four PCR methods were set up: three of them described in literature and the last prepared employing primers designed using GenBank sequences. Such reaction showed adequate sensibility and specificity.

INTRODUZIONE

L'encefalitozoonosi è una parassitosi cronica latente sostenuta dal microsporidio *Encephalitozoon cuniculi* (Gram positivo, sporigeno, parassita intracellulare obbligato), che colpisce diverse specie di mammiferi e in particolare roditori e lagomorfi.

La trasmissione della patologia avviene principalmente per via orale, attraverso l'ingestione di cibo contaminato da feci e soprattutto urine contenenti le spore. In corso di disseminazione si riconoscono una fase acuta con coinvolgimento di polmoni, reni e fegato e una fase cronica in cui gli organi target sono reni, encefalo e cuore.

Le lesioni causate da *E. cuniculi* interessano principalmente reni ed encefalo, con quadri caratterizzati da nefrite interstiziale di diverso grado e meningoencefalite non suppurativa (5).

Il decorso della patologia ha luogo perlopiù in forma subclinica. Nelle forme clinicamente manifeste si osserva una sintomatologia prevalentemente di tipo nervoso.

La messa a punto di valide tecniche per la diagnosi di *E. cuniculi* è ancora motivo di studio. Le metodiche in uso nella diagnosi *post mortem* sono l'esame anatomoistopatologico e l'esame immunoistochimico (2, 3). La conferma della parassitosi *in vitam* presenta ulteriori limiti in quanto si basa esclusivamente sull'esame sierologico, al quale non è possibile affiancare la valutazione macro e microscopica. Attualmente il tentativo è quello di mettere a punto la tecnica di PCR, già largamente utilizzata in medicina umana, come metodica per la diagnosi di *E. cuniculi*. Questo permetterebbe di avere a disposizione uno strumento di diagnosi eziologica molto sensibile da utilizzare in sede autoptica su reni, ma anche direttamente dalle urine di animali vivi, sebbene l'eliminazione del parassita sia intermittente.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato eseguito con l'obiettivo di mettere a punto una metodica PCR capace di amplificare materiale genetico specifico di *E. cuniculi* da reni di coniglio. La reazione ha previsto le fasi di seguito riportate.

1) Estrazione del DNA: utilizzando lo strumento Tissue Lyser (Qiagen) per 10 min a 30.0 Hz, è stata effettuata

una disgregazione meccanica della parete delle spore. Il campione è stato quindi sottoposto a procedura di estrazione specifica per i microrganismi Gram positivi con kit Sigma Bacterial.

2) Preparazione della miscela di reagenti e amplificazione del DNA estratto: sono state testate 4 diverse reazioni di amplificazione, ognuna delle quali caratterizzata da *primers* specifici, appropriate concentrazioni e volumi dei vari costituenti della miscela di reazione e caratteristici profili termici di amplificazione.

Reazione 1

La miscela di reazione, le sequenze oligonucleotidiche EnceF (5' - ATG AGA AGT GAT GTG TGT GCG -3') ed EnceR (5'-TGC CAT GCA CTC ACA GCC ATC - 3') utilizzate come *primers* e i profili termici di reazione sono stati eseguiti come descritto da Rossi *et al.*, 1998 (6).

Reazione 2

La medesima coppia di *primers* è stata utilizzata anche in una reazione caratterizzata da concentrazione dei reagenti della Mastermix e profilo termico leggermente diversi dalla reazione precedente, secondo la descrizione di Valencakova *et al.* 2005 (7).

Reazione 3

La miscela di reazione, le sequenze oligonucleotidiche EcunF1 (5' – TCC TAG TAA TAG CGG CTG ACG AA – 3') ed EcunR2 (5' – ACT CAG GAC TCA GAC CTT CCG A – 3') utilizzate come *primers* e i profili termici di reazione sono stati eseguiti come descritto da Hester *et al.*, 2002 (4).

La descrizione del numero di cicli e dei profili termici utilizzati per le reazioni 1-3 è riportata in Tabella 1.

Tabella 1. Descrizione dei profili termici delle reazioni 1-3.

REAZIONE	DENATURAZIONE (°C/secondi)	ANNEALING (°C/secondi)	ESTENSIONE (°C/secondi)
1	94°C/30"	55°C /60"	72°C/120"
	35 cicli		
2	95°C/45"	48°C/60"	72°C/60"
	30 cicli		
3	95°C/30"	58°C/30"	72°C/30"
	40 cicli		

Reazione 4

Al fine di ottenere un'adeguata amplificazione del materiale genetico è stata allestita una PCR *booster*, caratterizzata da due reazioni successive con l'utilizzo dei medesimi primers e reagenti alle stesse concentrazioni.

Volumi e concentrazioni dei reagenti impiegati per la preparazione della Mastermix di ciascuna delle due reazioni sono riportati in Tabella 2.

Tabella 2. Concentrazioni e volumi dei costituenti della miscela di reazione.

REAGENTE	CONCENTRAZIONE D'USO	V O L U M E D'USO (µl)
Acqua ultrapura		31
Buffer Gold (10X)	1X	5
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 mM	3
dNTPs (10 mM)	0.8 mM (0.2 mM ciascuno)	4
EculiF (50 µM)	0.8 µM	0.8
EculiR (50 µM)	0.8 µM	0.8
AmpliTaQ Gold 250 U (5U/µl)	2 U (0.05 U/µl)	0.4

Per il disegno dei *primers* sono state valutate le sequenze geniche della specie di interesse pubblicate nella banca dati GenBank, consultabile nel sito del National Centre for Biotechnology Information (8). Le sequenze oligonucleotidiche identificate EculiF (5' - GAT CGG AAG GTC TGA GTC CTG - 3') ed EculiR (5' - CCA AGC TTA TGC TTA AGT TCA AG - 3') amplificano un frammento della subunità ribosomiale 16 S di *E. cuniculi* della grandezza di 264 paia di basi. La specificità delle sequenze oligonucleotidiche individuate è stata verificata valutando la percentuale di omologia con il genoma di tutte le altre specie attraverso il programma BLASTn. La sequenza genica adeguata è stato registrata all'interno della banca dati con codice di accesso GU7354480.1.

Le reazioni di amplificazione sono state condotte in termociclatore GeneAmp PCR System 2700, dopo aver addizionato a 45 µl di Mastermix 5 µl dell'estratto dei campioni, inclusi il bianco di estrazione e il controllo positivo della reazione. Il controllo negativo di PCR è stato allestito aggiungendo alla mix 5 µl di acqua ultrapura.

Il profilo termico della prima reazione ha previsto:

Denaturazione: 95°C, 10 minuti
Denaturazione: 94°C, 30 secondi
Annealing: 62°C, 30 secondi
Estensione: 72°C, 30 secondi
Estensione finale: 72°C, 5 minuti

} 25 cicli

Il profilo termico della seconda reazione ha previsto:

Denaturazione: 95°C, 10 minuti
Denaturazione: 94°C, 30 secondi
Annealing: 62°C, 30 secondi
Estensione: 72°C, 30 secondi
Estensione finale: 72°C, 5 minuti

} 40 cicli

3) Elettroforesi in gel di agarosio e lettura dei risultati.

Per la valutazione di sensibilità e specificità delle diverse reazioni sono state eseguite le relative prove.

Prove di sensibilità

Al fine di valutare la concentrazione minima di spore rilevabili attraverso la reazione di amplificazione del DNA, sono state effettuate cinque diluizioni seriali in base 10 ottenute partendo da una soluzione di spore di *E. cuniculi* con concentrazione 10⁶-10⁷ spore/ml.

Prove di specificità

Non è stato possibile valutare possibili amplificazioni non specifiche di altre specie di microsporidi, in quanto non erano disponibili i relativi controlli positivi. Tuttavia, per testare la specificità degli amplificati, alcuni campioni positivi

scelti casualmente sono stati sottoposti a sequenziamento genomico. Un'ulteriore prova di specificità è stata effettuata per escludere la possibilità delle coppie di *primers* selezionate di amplificare DNA di coniglio.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Le reazioni di PCR 1 e 2 non sono risultate in grado di amplificare DNA specifico di *E. cuniculi*. Infatti, tali reazioni, eseguite in seguito alla fase di estrazione del materiale genetico effettuata sulla soluzione di controllo positivo, non hanno dimostrato l'amplificazione dei frammenti di DNA di dimensione attesa. Il risultato può essere spiegato valutando che in entrambi i lavori considerati le spore di *E. cuniculi* erano coltivate e isolate su linee cellulari di rene di coniglio prima di essere testate mediante PCR. Pertanto, risulta evidente come la sensibilità considerata adeguata per campioni caratterizzati da una concentrazione elevata di spore risulti insufficiente nel rilevare le concentrazioni particolarmente esigue che si riscontrano in reni di animali naturalmente infetti da encefalitozoonosi (1).

La reazione 3 si è dimostrata in grado di amplificare DNA di interesse dall'estratto della soluzione di controllo contenente spore di *E. cuniculi*, ma non dal tessuto renale. Le prove di specificità hanno rivelato la capacità dei *primers* utilizzati di legarsi a porzioni di materiale genetico conservato di coniglio che, essendo presente nel tessuto renale in concentrazione nettamente superiore a quello del parassita, comportava il consumo dei reagenti disponibili.

La reazione di PCR *booster* (reazione 4) è risultata in grado di amplificare materiale genetico specifico da reni di coniglio naturalmente infetti. Gli amplificati dei campioni positivi sottoposti a sequenziamento genomico hanno evidenziato la presenza di materiale genetico riferibile alla specie *E. cuniculi* con un'omologia del 99%, dimostrando l'elevata specificità della metodica. Le diluizioni della soluzione di controllo effettuate, hanno permesso di stimare la sensibilità della metodica intorno a 10³-10⁴ spore/ml (Figura 1).

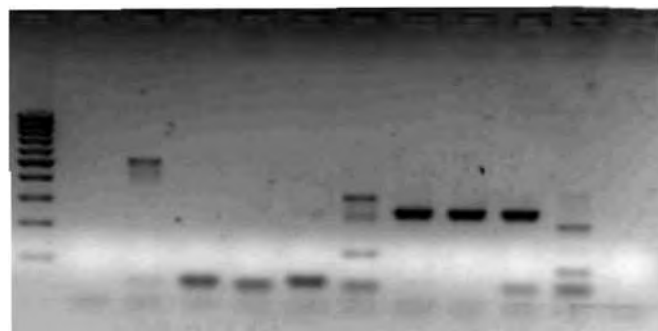


Figura 1: prova di sensibilità della Reazione 4
Lane1: marker; lane 2: bianco estrazione; lane3: bianco PCR; lane 4: diluizione -6; lane 5: diluizione -5; lane 6: diluizione -4; lane 7: diluizione -3; lane 8: diluizione -2; lane 9: diluizione -1; lane 10: intero; lane 11: bianco PCR.

In relazione ai risultati ottenuti nel corso delle prove eseguite per la messa a punto di una metodica sensibile e specifica è quindi stata confermata la validità diagnostica solamente della reazione 4. Tuttavia, considerando la concentrazione di spore particolarmente ridotta presente nel tessuto renale di animali infetti, la sensibilità della reazione messa a punto può essere considerata discreta e sarebbe auspicabile

eseguire ulteriori prove per incrementarla. Il nostro tentativo di aumentare la sensibilità inserendo ulteriori cicli di reazione è risultato inefficace in quanto causava l'amplificazione di frammenti aspecifici e la formazione di bande inattese.

BIBLIOGRAFIA

1. Csokai J., Joachim A., Gruber A., Tichy A., Pakozdy A., Kunzel F., (2009). Diagnostic markers for encephalitozoonosis in pet rabbits. *Veterinary Parasitology*, 163, p: 18-26.
2. Gibelli L., Lavazza A., Tittarelli C., Rota Nodari S., Nassuato C., Gelmetti D. (2011). Proceedings of the Congr. Naz. ASIC, Forlì, Italy, 8-9 Aprile 2011.
3. Giordano C., Weigt A., Vercelli A., Rondena M., Grilli G., Giudice C, (2005). Immunohistochemical identification of *Encephalitozoon cuniculi* in Phacoclastic uveitis in four rabbits. *Veterinary Ophthalmology*, 4 (8), p: 271-275.
4. Hester J. D., Varma M., Bobst A.M., Ware M. W., Lindquist H. D. A., Schaefer III F. W., (2002). Species-specific detection of three human-pathogenic microsporidial species from the genus *Encephalitozoon* via fluorogenic 5' nuclease PCR assays. *Molecular and Cellular Probes*, 16, p: 435-444.
5. Militerno G., Morandi F., Toffetani L., Trevisani M., Marcato P. S., (2006). Encefalitozoonosi (*E. cuniculi*) in conigli macellati della Romagna e del Veneto: quadri anatomoistopatologici ed ultra strutturali. Atti III Congresso nazionale AIPvet, Pisa, 11-13 Maggio 2006.
6. Rossi P., La Rosa G., Ludovisi A., Tamburini A., Gomez Morales M. A., Pozio E., (1998). Identification of a human isolate of *Encephalitozoon cuniculi* type I from Italy. *International Journal of Parasitology*, 28 (9), p: 1361-1366.
7. Valencakova A., Balent P., Novotny F., Cislakova L., (2005). Application of a specific primers in the diagnosis of *Encephalitozoon* spp. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 12, p: 321-323.
8. www.ncbi.nlm.nih.gov/

OCRATOSSINA A NELL'ALIMENTAZIONE UMANA: VALIDAZIONE DI UN METODO IMMUNOENZIMATICO

De Pace R., Franchino C., Vita V.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata, S.S. Micotossine e Tecniche Immunoenzimatiche
Via Manfredonia, 20 71100 Foggia, Italia.*

Keywords: ocratossina, validazione, tossicità

ABSTRACT

With the immunoenzymatic method "ELISA" we are able to scan a large number of samples of food in a short time and with accurate quantitative analytical results.

This work presents the results of the validation process for an immunoenzymatic procedure for the research of ocratoxin A in food for human use in agreement with the Decision 2002/657/CE (1).

INTRODUZIONE

Le micotossine sono metaboliti secondari di microscopici funghi, tossici per gli animali superiori, con un peso molecolare relativamente basso, alta stabilità e una struttura specifica racchiusa nella tassonomia dei microorganismi produttori. La contaminazione da micotossine nell'uomo avviene mediante passaggio da vegetali contaminati o da prodotti alimentari. Gli alimenti maggiormente esposti alla contaminazione sono: cereali, frutta secca, legumi, spezie, caffè, cacao, formaggio e insaccati (2). L'Ocratossina A, prodotta dai funghi *Penicillium* e *Aspergillus*, è classificata come cancerogeno di gruppo 2B, cioè sostanza sicuramente cancerogena per gli animali e possibilmente anche per l'uomo (IARC1993,WHO2002)(3). Questa tossina può provocare danni all'intero organismo, essendo capace di legarsi alle siero-albumine del sangue: tale interazione è responsabile della diffusione sistemica della stessa. Il TDI (Tollerable Daily Intake) è stato fissato a 5 ng/kg pc/die, ciò vuol dire che i primi sintomi di tossicità si manifestano già con l'assunzione, attraverso alimenti contaminati, di 5 ng/kg di peso corporeo al giorno. Le uniche possibilità di contenimento per limitare l'esposizione della popolazione alle micotossine, entro una dose tollerabile sono: l'attuazione delle più corrette pratiche agricole e di stoccaggio, un adeguato autocontrollo di tutte le fasi della filiera, la selezione rigorosa di tutte le materie prime impiegate.

Sulla base delle disposizioni indicate nel Regolamento 882/2004/CE (4) ed a seguito della fissazione di limiti massimi ammissibili, secondo quanto stabilito dal Regolamento 1881/2006/CE (5), si rende oggi necessario disporre di metodi di controllo validati (8) per la determinazione di residui nei prodotti destinati all'alimentazione umana e zootecnica da utilizzarsi nell'ambito dei controlli ufficiali.

MATERIALI E METODI

Campionamento.

I campioni di cereali, oggetto del nostro studio di validazione, sono stati reperiti dalle USL e dalle Sanità Marittime e di Frontiera (USMAF) ai sensi del Regolamento 401/2006/CE del 23 febbraio 2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari (6).

Preparazione dei campioni.

La procedura di preparazione del campione prevede le seguenti fasi:

- Macinare finemente il campione;
- Aggiungere HCl 1N e agitare per 5';
- Aggiungere diclorometano ed agitare energicamente per 15 minuti in posizione orizzontale;
- Centrifugare per 15 minuti a 3500 giri;
- Eliminare lo strato acquoso superiore;
- Filtrare con carta bibula lo strato di diclorometano che si forma sotto la parte solida;
- Aggiungere al filtrato una uguale quantità di NaHCO₃ 0,13M pH 8,1 ed agitare per 15 minuti;
- Centrifugare a 3500 giri per 15 minuti;
- Diluire (1:5) la fase prelevata con NaHCO₃ 0,13M.

Procedura analitica.

Le analisi sono state effettuate in doppio per ogni singolo campione utilizzando un metodo immunoenzimatico (ELISA) e nello specifico un kit dell'r-biopharm.

Le specifiche del kit sono: LOQ = 50ng/kg

Cross-reattività: Ocratossina A 100%

Soluzioni standards: 0,50,100,300,900,1800 ng/kg.

Il recupero medio ottenuto durante le prove di validazione è stato del 82%.

Performances studiate:

Specificità e verifica dell'errore β
Robustezza
Precisione

RISULTATI E DISCUSSIONE

Le prove per la verifica della specificità e dell'errore β (<5%) sono state condotte parallelamente, infatti, a ciascun bianco-campione è stato associato il suo fortificato al livello di interesse nella stessa seduta analitica.

Pertanto, sono stati testati 20 bianchi-campione rappresentativi e i relativi fortificati a 5 ppb con ocratossina A. Dato l'elevato numero di prove sono state eseguite 2 sedute analitiche.(Tab.1-2)

Tab.1 Prima seduta analitica specificità

N. campione	Tipo campione	B/B0(%) Bianco campione	B/B0(%) Fortificati
1	Avena	91,91	62,08
2	Farro	86,98	65,11
3	Grano duro	95,42	53,88
4	Grano duro	86,35	69,8
5	Orzo	89,89	59,81
6	Orzo	88,34	72,82
7	Farro	86,29	57,8
8	Mais	96,86	72,88
9	Mais	108	59,7
10	Mais	91,62	60,99
media		92,16	63,48
dev std.		6,65	6,48
varianza		44,22	41,99

Tab.2 Seconda seduta analitica specificità

N. campione	Tipo campione	B/B0(%) Bianco campione	B/B0(%) Fortificati
11	Avena	91,85	61,38
12	Orzo	100,05	70,55
13	Grano duro	90,35	59,79
14	Grano duro	87,2	64,94
15	Farro.	95,58	53,85
16	Farro	96,44	72,61
17	Orzo	108,32	59,91
18	Mais	87,7	72,41
19	Mais	102,14	57,61
20	Mais	90,44	61,58
media		95,05	63,46
dev std.		6,81	6,47
varianza		46,37	41,86

ANALISI BIANCHI:

VALORE MEDIO B/Bo: 92,16% prima seduta analitica,
95,05% seconda seduta analitica.

SCARTO TIPO: 6,65% prima seduta analitica,
6,81% seconda seduta analitica.

ANALISI CAMPIONI FORTIFICATI:

LIVELLO DI FORTIFICAZIONE: 5 µg/Kg.

VALORE MEDIO B/Bo: 63,48% prima seduta
analitica, 63,46% seconda seduta analitica.

SCARTO TIPO: 6,48% prima seduta, 6,47% seconda seduta.

ANALISI STATISTICHE.

Le analisi statistiche sono state condotte con un programma computerizzato calcolando la varianza (ANOVA test), il test

di Fisher, il test di Student. Le variabili sono state modificate utilizzando piani sperimentali secondo la procedura elaborata da Youden. Il metodo è risultato robusto per i parametri: preparazione del campione, apertura kit, filtrazione campioni, temperatura kit, tempo di agitazione manuale e tempo di centrifugazione.

La precisione è stata eseguita su tre livelli di fortificazione: 3-5-10 µg/kg.

Tab.3: precisione

FORTIFICATI	3 ug/kg:	5 ug/kg	10 µg/kg
VALORE MEDIO ug/kg	2,36	4,41	7,83
SCARTO TIPO %	0,33	0,24	0,40
RECUPERO %	79	88,5	78,5

DISCUSSIONE

Il metodo validato è risultato idoneo allo scopo della ricerca di Ocratossina A in campioni di cereali destinati all'alimentazione umana ed è stato recentemente accreditato da Accredia (PT/CH/215:2009 Rev. 1). Il metodo viene costantemente verificato, sia mediante la costruzione semestrale di carte di controllo, sia mediante la partecipazione a ring test organizzati dalla FAPAS (Food and Environment Research Agency) e AIA (Associazione Italiana Allevatori). Dalle analisi finora effettuate su matrici di cereali non trasformati, prelevati in maniera ufficiale dagli organi competenti (USMAF, ASL), non si segnalano alti livelli di contaminazione e conseguentemente rischi per la salute umana. Tuttavia considerando che è l'effetto cronico, ovvero l'accumulo nel tempo di piccole quantità di micotossine, il più grave rischio derivante da alimenti contaminati, non bisogna abbassare il livello di vigilanza messo in atto, sia applicando i più rigorosi standard di verifica che monitorando nel tempo la prestazione del metodo per fornire dichiarazioni di conformità affidabili e accettate a livello internazionale.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- 1) Decisione della Commissione del 12 Agosto (2002/657/CEE). G.U.C.E. L221, 2002.
- 2) Battimani P., Pietri A., Piva G., 2005. Micotossine, dal campo alla tavola. L'Informatore Agrario, 1 (Suppl): 7-11.
- 3) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks Humans Volume 56, 1993 489-521
- 4) Regolamento (CE) n. 882/2004 GUCE L 165/1, 30 aprile 2004.
- 5) Regolamento (CE) n. 1881/2006 GUCE L364/5, 20 dicembre 2006, aggiornato il 23.07.2008.
- 6) Regolamento (CE) n. 401/2006 GUCE L70/12, 9 marzo 2006.

IMPORTAZIONE DI GRANO DURO E TENERO IN PUGLIA NELL' ANNO 2010: MONITORAGGIO DELLE PRINCIPALI MICOTOSSINE E DELLA QUALITÀ MERCEOLOGICA

De Pace R.¹, Vita V.¹, Menga V.², Fares C.²

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata, S.S. Micotossine e Tecniche Immunoenzimatiche
Via Manfredonia, 20 71100 Foggia, Italia.

² CRA-CER, Centro di Ricerca per la Cerealcoltura, S.S. 16, Km 675, 71100 Foggia, Italia.

Keywords: micotossine, validazione, qualità merceologica

ABSTRACT

In 2010, the Istituto Zooprofilattico di Puglia and Basilicata, as accredited laboratory Accredia, according to Reg 882/2004 (1), in collaboration with the CRA Center for Cereal Research of Foggia, began the analytical controls about the health (with the search of main mycotoxins) and technology quality on samples of hard and soft wheat imported from foreign countries, taken by competent authorities responsible for official controls.

INTRODUZIONE

I cereali rappresentano fra le derrate alimentari di origine vegetale una delle matrici a più alto rischio di contaminazione da micotossine. Le micotossine identificate attualmente sono più di 300, i principali miceti produttori di micotossine appartengono ai generi, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* la cui tossinogenesi è favorita da idonea umidità (<70%) e temperatura (20-25°C) infestazioni di insetti, pratiche colturali inadeguate, e scorrette pratiche di conservazione, in post raccolta e durante il trasporto e lo stoccaggio. L'infezione delle piante da parte di funghi patogeni durante la coltivazione può comportare la permanenza dei funghi stessi (e/o delle micotossine da essi prodotte) non solo nella materia prima tal quale (cariossidi) ma anche nei sottoprodotti e prodotti finiti (sfarinati, mangimi, pane e pasta) (2).

Tra le possibili soluzioni tecnologiche rivolte all'abbattimento della carica batterica totale dei lieviti e delle muffe e quindi delle micotossine dalla superficie delle cariossidi si annovera la decorticazione pre-macinazione. La qualità della pasta italiana, la migliore al mondo, è determinata principalmente dalle caratteristiche tecnologiche della semola che deve avere adeguate quantità di glutine e di composti carotenoidi, che determinano ottime caratteristiche nutrizionali e di cottura.

Scopo del lavoro è stato di verificare sia lo stato igienico sanitario del grano importato attraverso la ricerca delle principali micotossine che le caratteristiche nutrizionali e qualitative.

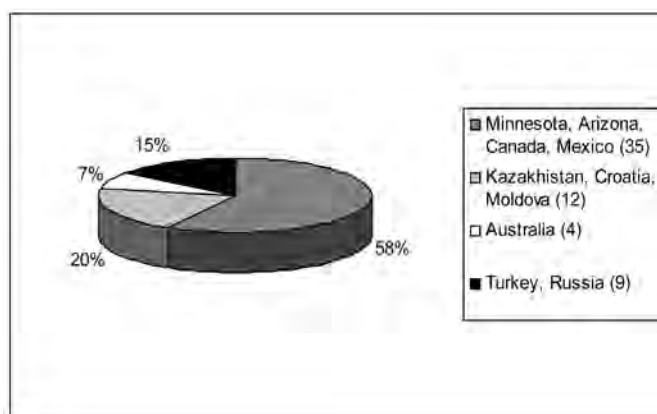
MATERIALI E METODI

Prelievo dei campioni e macinazione

Oggetto di studio in questo lavoro sono stati 60 campioni di grano duro e tenero di diverse provenienze, analizzati sia per gli aspetti qualitativi che igienico-sanitari: il 58 % dall' America (Canada, Arizona, Minnesota, Messico); il 15% da Turchia e Russia; il 20% da Kazakistan, Moldavia, Croazia; il 7% da Australia. (Fig.1)

Il grano nelle stive delle navi o su camion è prelevato da personale tecnico USMAF (Sanità Marittima, Aerea e di Frontiera) secondo le procedure stabilite dal Reg. CE 401/2006 (3). Utilizzando, preferibilmente, il campionamento dinamico, si preleva, in tempi diversi, la massa del campione in movimento, utilizzando nastri trasportatori o campionatori automatici. Questa procedura garantisce una maggiore omogeneità delle micotossine nel campione, poiché, generalmente, queste, si distribuiscono a macchia di leopardo (4).

Fig. 1: Provenienza dei campioni di grano duro e tenero (60 in totale) prelevati dall'USMAFF e AASSLL



Estrazione e quantificazione delle micotossine

Per la fase di estrazione delle micotossine (Aflatossina B1, Ocratossina A, Zearalenone, Fumonisin e Deossinivalenolo) dai campioni di grano, abbiamo utilizzato le procedure indicate dalle ditte produttrici dei kit immunoenzimatici (Tecna ed R-Biopharm), accreditate ai sensi UNI CEI EN ISO/IEC/17025, in ottemperanza all' art.12 del Reg CE 882/2004, la Decisione 2002/657/CE (5) e il Reg. CE 401/2006.

I kit sono controllati periodicamente attraverso carte di controllo e circuiti interlaboratorio organizzati da Food Analysis Performance Assessment Scheme (Fapas) e Associazione Italiana Allevatori (A.I.A.).

Analisi merceologiche e tecnologiche della granella

Le analisi merceologiche sono state eseguite sulla granella tal quale. E' stato determinato il peso ettolitrico ed il contenuto proteico mediante Infratec Grain Analyzer 1241 (FossElectric).

Analisi statistica

I parametri considerati nella validazione delle micotossine, in base alla Decisione 2002/657/CE, sono: la specificità, la verifica dell'errore β , la precisione e la robustezza. Questi parametri sono valutati con i test statistici del calcolo della varianza (test ANOVA), test di Fisher e il test di Student. I metodi immunoenzimatici possono presentare una leggera sovrastima perciò i campioni positivi allo Screening Elisa sono confermati con metodo cromatografico HPLC (High

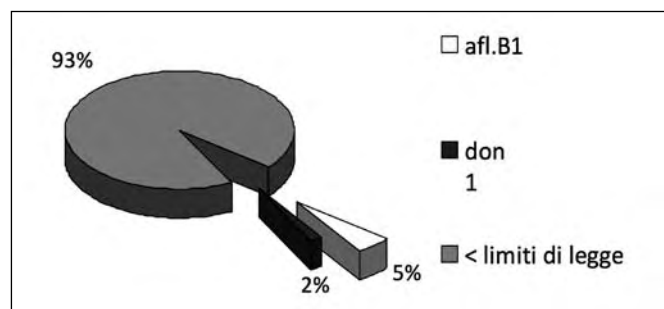
Performance Liquid Chromatography) dall'Istituto Superiore di Sanità e dall'Istituto Zooprofilattico di Roma, che hanno evidenziato dati analitici sovrapponibili a quelli riscontrati nel nostro laboratorio. (6).

RISULTATI E DISCUSSIONI

Analisi micotossine

Nei campioni analizzati (Figura 2) abbiamo riscontrato, una positività del 5% alla aflatoossina B1 in campioni di grano duro provenienti dalla Turchia e dalla Moldavia, e, una positività pari al 2% al Don in campioni di grano tenero proveniente dalla Croazia. Nel 93% dei restanti campioni analizzati, provenienti dall'America e dal Kazakistan, abbiamo riscontrato concentrazioni di micotossine, minori dei limiti di legge definiti dai Reg.1881/2006 e 1127/2007 (7 e 8) e comprese tra 0,005 -1,93 ug/kg per l'aflatoossina B1, 92,5-1300ug/kg per Don, 35-58,81 ug/kg per zearalenone e 1,25-3,60 ug/kg per ocratossina A.

Fig.2 : % di campioni positivi



Qualità tecnologica

Le caratteristiche merceologiche dei campioni analizzati (Figure 3-4) risultano buone, e se consideriamo i valori di peso ettolitrico, circa il 75% dei valori osservati, supera il valore di 80kg mentre solo il 25% si colloca al disotto. Il contenuto proteico dei campioni, indice collegato alla qualità pastificatoria del grano duro, è buono, poiché compreso tra i valori di 13% e oltre 15%, e solo una parte molto esigua, pari a poco più del 3%, scende sotto il valore del 13%.

Fig.3: Peso ettolitro

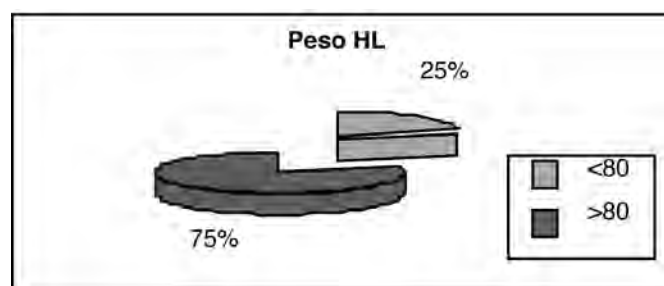
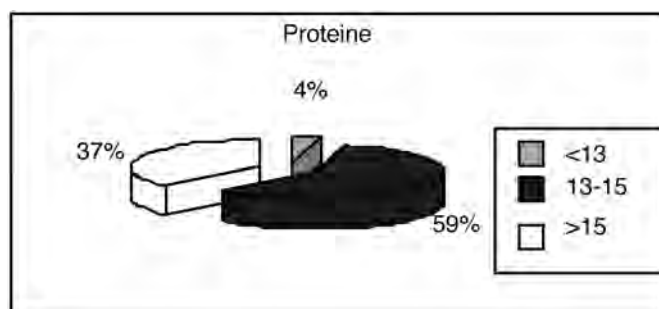


Fig.4: Contenuto proteico



Dalle analisi effettuate, sia la qualità merceologica che igienico sanitaria relativa alle micotossine, delle partite di frumento duro e tenero di importazione negli anni 2010 è risultata sicuramente elevata, ma, non si può non sottolineare, che una piccola quota di grano importato è scadente e presenta il maggior numero di segnalazioni positive alle micotossine.

Dato che le materie prime esaminate sono sottoposte ad ulteriori trattamenti come la decorticazione e la macinazione, che abbattano eventuali residui di micotossine, possiamo considerare che i dati riscontrati, sono abbastanza confortanti. Tuttavia è importante continuare l'attività di sorveglianza in maniera continua e costante per garantire la salvaguardia della salute dei consumatori.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- 1) Regolamento (CE) n. 882/2004 GUCE L 165/1, 30 aprile 2004.
- 2) R. Bognanni - M. Lo Bianco - G. Saimbene G. Gallo* Micotossine nella granella di frumento duro: sanità alimentare delle produzioni siciliane. tecnica molitoria 2007 865.
- 3) Regolamento (CE) n. 401/2006 GUCE L70 /12, 9 marzo 2006.
- 4) C. Brera, ed al. Aspetti generali e pratici legati alla implementazione della normativa europea sul campionamento e la preparazione del campione nell' analisi delle micotossine ISTISAN 07/37
- 5) Decisione della Commissione del 12 Agosto (2002/657/CEE). G.U.C.E. L221, 2002.
- 6) Brera Carlo (2009). La gestione della qualità e della sicurezza nell' industria alimentare:aggiornamenti metodologici. Seminari di Qalyfood.Cremona 17 aprile 2009
- 7) Regolamento (CE) n. 1881/2006 GUCE L364/5, 20 dicembre 2006, aggiornato il 23.07.2008.
- 8) Regolamento (CE) n. 1126/2007 GUCE L 255, 29 settembre 2007.

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEI CEPPI DI PCV2 CIRCOLANTI NEI CINGHIALI IN SARDEGNA

Dei Giudici S., Angioi P., Manca A. F., Vidili M. L., Zinellu S., Oggiano A.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna

Keywords: PCV2, PCR, phylogenetic analysis.

ABSTRACT – Molecular characterization of PCV2 strains circulating in Sardinian wild boars.

The aim of this work is to establish the genetic characteristics of Porcine Circovirus Type II (PCV2) strains circulating in Sardinian wild boars. The molecular characterization was done on 13 positive samples collected from wild boars captured in two well delimited area of the northern Sardinia countryside, Goceano and Porto Conte Natural Park. The viral DNA, extracted from wild boar organs was detected by Real time PCR. The positive samples were subjected to genomic sequencing and phylogenetic analysis.

INTRODUZIONE

Il circovirus suino Tipo 2 (PCV2) è responsabile, da solo e/o in associazione con altri patogeni, di diverse sindromi patologiche che colpiscono i suini e i cinghiali, indicate con il termine generico di Porcine Circovirus Disease (PCVD) ed è causa di ingenti danni economici e sanitari.

PCV 2 è diffuso in tutti i paesi a suinicoltura avanzata e la quasi totalità degli allevamenti suini nei paesi europei presenta positività sierologica (1). Il virus appartenente alla famiglia Circoviridae, genere *Circovirus*, ha un diametro di circa 17-22 nm, simmetria icosaedrica ed è privo di envelope; il genoma è costituito da DNA a singolo filamento circolare con peso molecolare di 1.767-1.768 kb con polarità ambisenso ed è costituito da sei ORFs; i più importanti sono l'ORF1 o *rep*, che codifica per le proteine associate alla replicazione virale, e l'ORF2 o *cap*, che codifica per le proteine strutturali capsidiche. La proteina Cap è la maggiore proteina strutturale espressa dall'ORF2 ed è la responsabile della alta variabilità antigenica del virus (2), uno dei fattori a cui è dovuta la difficoltà di controllo delle patologie associate al PCV2. Attualmente si conoscono tre genotipi differenti di PCV2 (PCV2a, 2b e 2c) e nel 2008 è stata proposta una nomenclatura unificata che ha sostituito le precedenti esistenti in letteratura (3).

Sieropositività e virus positività del cinghiale a PCV2 erano già state segnalate in precedenza (4,5) in Sardegna. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di analizzare e confrontare le sequenze genomiche dei ceppi di PCV2 ottenuti. La caratterizzazione molecolare del PCV2 è stata condotta su campioni positivi di cinghiali selvatici cacciati in un due zone molto diverse dell'isola: il Goceano, area ben delimitata del centro-nord dell'isola, nella quale il cinghiale e il suino allevato allo stato brado condividono lo stesso habitat, e il Parco Naturale Regionale di Porto Conte nel quale non vi è la possibilità per il cinghiale di entrare in contatto con il domestico.

MATERIALI E METODI

Campioni esaminati

Sono stati esaminati 87 cinghiali selvatici abbattuti durante le campagne venatorie 2008-2009 e 2009-2010 in Goceano e 78 cinghiali abbattuti durante la campagna di riduzione del numero di animali nel Parco di Porto Conte nel 2010-2011. I campioni esaminati erano costituiti da milza e linfonodi tracheo bronchiali. L'estrazione del DNA genomico è stata eseguita con il Kit High Pure PCR Template Preparation (Roche) su omogenati d'organo al 10% in PBS.

La ricerca del genoma di PCV2 è stata condotta mediante Real Time PCR (6) in un volume di 25 µl contenente 12.5 µl di TaqMan2X PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.9 µM di primers P1570 e P1642, 0.2 µM di TaqMan probe, 2.5 µl di DNA template. E' stato utilizzato lo strumento 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), con il seguente ciclo di reazione: attivazione iniziale della polimerasi a 95°C x 10', seguita da 40 cicli a 95°C x 15" e 60°C x 1'.

Sequenziamento genomico: per la reazione di sequenza è stata amplificata una porzione dell'ORF2 compresa fra i primers PMWS150 e PMWS1443 (7). La reazione è stata condotta in un volume di 50 µl contenente 5 µl di Buffer 10X (Invitrogen), 2.5 mM di MgCl₂, 200 µM di dNTPs, 0.2 µM di entrambi i primers, 1.25 U di Taq Platinum (Invitrogen). Il ciclo termico utilizzato è stato il seguente: denaturazione iniziale a 95°Cx5', 35 cicli a 95°Cx1', 60°Cx1', 72°Cx1', estensione finale a 72°Cx10'. La banda attesa era di 481 bp, il prodotto ottenuto è stato visualizzato mediante elettroforesi in gel di agarosio al 2%.

Gli amplificati sono stati purificati con il kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up (Promega), secondo le istruzioni della ditta e sequenziati presso una ditta specializzata. Ogni campione è stato analizzato in doppio, ed ogni replica è stata sequenziata in direzione senso ed antisenso.

Le sequenze ottenute sono state inviate in banca dati (Blastn) per verificare la corretta identificazione ed allineate mediante il software ClustalW con le sequenze di riferimento disponibili in banca dati (Blastn). L'analisi filogenetica è stata effettuata utilizzando il metodo Neighbor-Joining (NJ) ed il software MEGA (versione 1.32). L'analisi statistica è stata condotta con il metodo Bootstrap su 1000 replicati.

RISULTATI

La figura 1 mostra il diagramma di amplificazione dei campioni ottenuto in Real Time PCR.

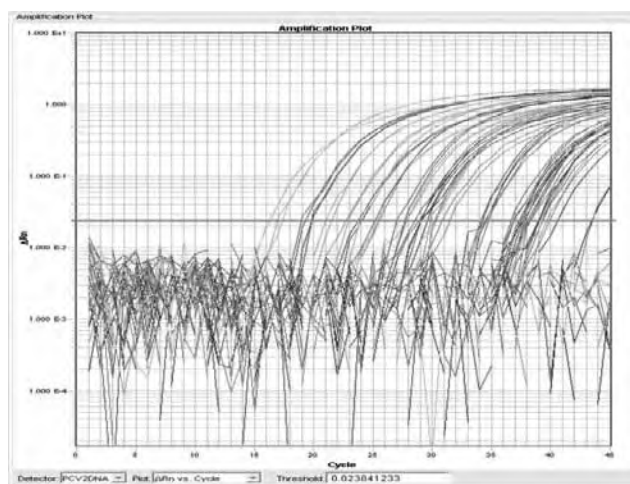


Figura 1. Diagramma di amplificazione della Real-Time PCR eseguita sui campioni di cinghiali.

I risultati complessivi sono evidenziati in tabella 1.

La percentuale di positività del PCV2 è risultata più elevata nei cinghiali nel Goceano (40,23%) rispetto a quella ottenuta nel Parco di Porto Conte (20,51%).

13 campioni fra i 51 positivi sono stati sequenziati, 7 provenivano dal Goceano e 6 dal parco di Porto Conte. L'analisi di sequenza ha mostrato una percentuale di similarità fra i campioni pari a 89-100%. L'analisi filogenetica condotta ha permesso di classificare 12 campioni come PCV2 genotipo b, ed il campione 644, proveniente dal Goceano, come PCV2a (figura 2).

	PORTO CONTE	GOCEANO
Analizzati	78	87
Positivi	16	35
% Positività	20,51	40,23%

Tabella1. Risultati ottenuti in Real-Time PCR

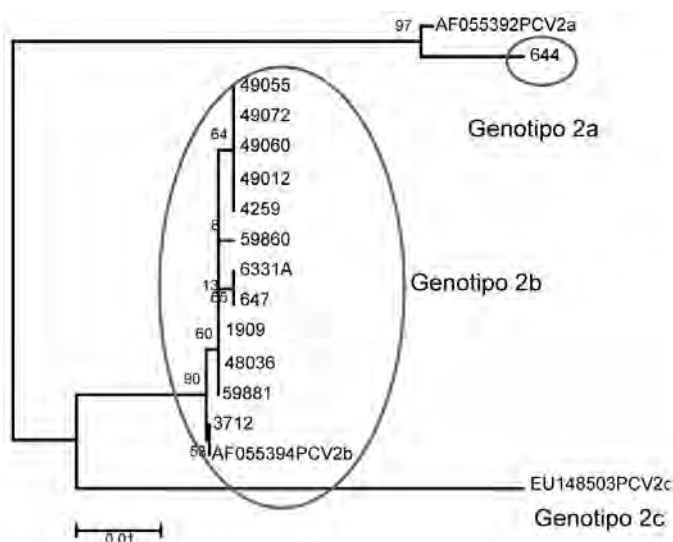


Figura 2. Albero filogenetico dei ceppi di PCV2 isolati nei cinghiali della Sardegna. Barra: sostituzioni per sito

DISCUSSIONE

I risultati di questo studio hanno mostrato una differente percentuale di positività virologica al PCV2 fra i cinghiali cacciati nel Goceano rispetto a quella riscontrata nel parco regionale di Porto Conte. Questa differenza potrebbe essere dovuta alle caratteristiche delle due aree analizzate cioè ai maggiori contatti che i cinghiali del Goceano hanno con i suini domestici. Infatti in questa zona della Sardegna il cinghiale viene facilmente a contatto con il suino che tradizionalmente viene allevato in modo estensivo, nonostante il vigente divieto di pascolo brado. Al contrario nel Parco Naturale Regionale di Porto Conte, il cinghiale non ha contatti con il domestico non solo perché l'area risulta ben delimitata, ma anche perché nella zona non vi sono allevamenti estensivi di suini.

Nell'ipotesi che questa differenza potesse essere dovuta alla circolazione di ceppi differenti, abbiamo condotto un'analisi molecolare volta alla loro caratterizzazione. I risultati mostrano

che non esistono differenze fra gli stipti circolanti nelle due zone della Sardegna, in esse prevale il genotipo 2b, ed è stato rilevato un solo ceppo, proveniente dal Goceano, ascrivibile al genotipo 2a. Manca totalmente il ceppo PCV2c, del resto segnalato solo in studi retrospettivi in Danimarca (7) e del quale esistono solo tre sequenze depositate in banca dati. Numerosi studi condotti sulla relazione esistente fra le sequenze genomiche dei ceppi di PCV2 ed il verificarsi delle malattie correlate hanno dato risultati contrastanti. Mentre lavori retrospettivi danesi (8) e spagnoli (9) hanno mostrato l'esistenza di uno shift genetico fra il PCV2a ed il PCV2b associato alla comparsa della PMWS (Post-weaning multisystemic wasting syndrome) in queste nazioni fra gli anni 90 e 2000. Risulta quindi interessante valutare se nei cinghiali sardi si sia verificato lo stesso situazione, come i dati in nostro possesso suggeriscono, e quale effetto questo fenomeno possa aver avuto nei suini domestici.

In conclusione questo studio per la prima volta analizza dal punto di vista molecolare le caratteristiche dei ceppi di PCV2 circolanti nei cinghiali in Sardegna. In futuro ci si propone di aumentare il numero di campioni analizzati per confermare i risultati ottenuti e confrontare le sequenze di cinghiale con quelle provenienti da suini domestici.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Segalés J., Domingo M., (2002). Post-weaning multisystemic syndrome (PMWS) in pigs. *Veterinary Quarterly* 2 : 109-124
2. Nawagitgul P., Morozov I., Bolin S.R., Harms P.A., Sorden S.D., Paul P.S., (2000). Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J. Gen. Virol.* 81: 2281-228.
3. Segalés L., Olvera A., Grau-Roma L. et al., (2008) PCV2 genotype and nomenclature. *Veterinary Record* 162, 867-868
4. Dei Giudici S., Demartis L., Chironi P., Sulas A., Ladu A., Sanna M.L., Rolesu S., Patta C., Oggiano A. (2010) Indagine sieroepidemiologica sulla diffusione di alcune patologie virali nei cinghiali in Sardegna. *Atti SIDILV*, p.219
5. Dei Giudici S., Angioi P., Canu M., Fiori E., Tola A., Zinellu S., Carboni M. V., Chironi P., Puggioni G., Oggiano A. (2011) Ricerca del genoma di PRRS, AD, PPV, PCV2, Pestivirus nei cinghiali in Sardegna. *Atti IV Workshop nazionale di virologia veterinaria*, p.39.
6. Yu S., Opriessnig T., Kitikoo P., Nilubol D., Halbur P. G., Thacker E. (2007). Porcine Circovirus type 2 (PCV2) distribution and replication in tissues and immune cells in early infected pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 115 261-272
7. Meehan BM., McNeilly F., McNair I., Walker I., Ellis JA., Krakowka S., Allan GM. (2001) Isolation and characterization of porcine circovirus 2 from cases of sow abortion and porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Archives of Virology* 2001; 146(4): 835-42.
8. Dupont K., Nielsen E.O., Baekbo P., Laersen L.E. (2008) Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotype with time. *Australian Veterinary Journal* 128, 56-64.
9. Cortey M., Pileri E., Sibila M., Pujols J., Balash M., Plana J., Segalés J. Genotypic shift of porcine circovirus type 2 from PCV-2a to PCV-2b in Spain from 1985 to 2008.

PRESENZA DI LARVE DI ANISAKIDAE IN TOTANI (*ILLEX COINDETI*) PESCATI NEL MAR LIGURE

Di Donfrancesco B.¹, Righetti M.¹, Serracca L.², Gustinelli A.⁴, Fioravanti M. L.⁴, Cencetti E.², Giorgi I.¹, Dellepiane M.³, Ercolini C.², Prearo M.¹, Pavoletti E.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino; ² Sezione Territoriale di la Spezia, Via degli Stagnoni, 96 – 19100 La Spezia; ³ Sezione Territoriale di Savona, Via Martini, 6 – 17100 Savona; ⁴ Dipartimento Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum, Via Tolara di sopra, 50 – 40064 Ozzano Emilia (BO).

Key words: Anisakidae, *Illex coindetii*, Mar Ligure.

INTRODUZIONE

Le malattie parassitarie trasmesse attraverso i prodotti della pesca che colpiscono l'uomo sono causate dall'ingestione di parassiti vitali appartenenti alle Classi Nematoda, Cestoda e Trematoda. Tra queste notevole importanza riveste l'Anisakiasi, sostenuta da nematodi appartenenti alla Famiglia Anisakidae. Gli adulti, di dimensioni notevoli (3-15 cm di lunghezza), vivono nell'apparato digerente di mammiferi marini (delfini, balene), di pinnipedi (leoni marini, foche) o di uccelli ittiofagi. Gli ospiti definitivi eliminano le uova con le feci. Se la temperatura dell'acqua è piuttosto bassa (5-7°C) le larve maturano e ben presto vengono ingerite dal primo ospite intermedio, rappresentato dal krill. Questi piccoli crostacei costituiscono il nutrimento per molte specie di pesci e cefalopodi e quindi rappresentano anche la via di trasmissione e di diffusione del parassita. Il ciclo si conclude quando gli ospiti definitivi si infestano ingerendo pesci o cefalopodi che contengono le larve. L'uomo è coinvolto nel ciclo biologico del parassita come ospite accidentale in seguito all'ingestione di prodotti ittici parassitati consumati crudi o sottoposti a preparazioni culinarie insufficienti ad inattivare le larve infettanti di terzo stadio. Successivamente all'ingestione le larve vitali si attivano e penetrano la mucosa gastrica o intestinale provocando sintomi addominali. Talvolta si può anche avere una migrazione extra-intestinale (10).

Molti sono i fattori che in questi ultimi anni hanno determinato un elevato interesse scientifico nei confronti di questi nematodi, in particolare dei generi sicuramente zoonotici quali *Anisakis* e *Pseudoterranova*.

I cefalopodi predatori, grazie al loro rilevante ruolo nelle catene trofiche marine (3), rappresentano importanti ospiti intermedi e paratenici nel ciclo biologico del parassita. Precedenti studi hanno dimostrato la loro suscettibilità ad essere infestati da svariati gruppi di parassiti acquatici marini (8).

Illex coindetii è un cefalopode della Famiglia Ommastrephida di notevole importanza economica, ampiamente diffuso in tutto il Mar Mediterraneo, nell'Oceano Atlantico orientale dalla Gran Bretagna meridionale alla Namibia e nell'Atlantico occidentale dal Mar dei Caraibi e Golfo del Messico fino allo Stretto della Florida (9). Si alimenta soprattutto di pesci come piccoli Sternoptichidi e Mictofidi mesopelagici (5).

Scopo del presente studio è stato quello di valutare la presenza di nematodi della Famiglia Anisakidae in totani appartenenti alla specie *Illex coindetii* pescati nel Mar Ligure e successivamente di effettuare un'identificazione morfologica di genere dei parassiti attraverso l'utilizzo della microscopia ottica.

MATERIALI E METODI

Tra gennaio ed agosto 2011 sono stati campionati, nel Mar Ligure, nei tratti di mare antistanti le coste comprese tra i comuni di Spotorno (SV) ed Arenzano (GE) e nell'area a nord dell'Isola d'Elba (LI), 581 totani. Sul peschereccio i cefalopodi

appena pescati, venivano posti sotto ghiaccio e una volta sbarcati, trasportati in laboratorio. Qui gli animali venivano misurati (lunghezza totale e del mantello), pesati e sottoposti a necropsia previa un'analisi visiva della superficie esterna. Il pacchetto viscerale veniva poi posto in piastre Petri contenenti soluzione fisiologica (0,85% NaCl); queste erano poi posizionate sotto una fonte di calore (lampada ad incandescenza 100 W) per almeno 10 minuti in modo tale da permettere la fuoriuscita dei parassiti eventualmente presenti all'interno.

Veniva poi effettuato un esame visivo della cavità celomatica. Per evidenziare i parassiti non fuoriusciti dopo esposizione alla fonte di calore, si effettuava la dissezione del pacchetto viscerale. Venivano registrati il numero di larve isolate da ciascun soggetto ed il loro stato di vitalità; queste erano poi poste in alcool 70°C. Successivamente, con l'ausilio del microscopio ottico e dopo un'eventuale chiarificazione con lattofenolo d'Amman, si procedeva ad un'identificazione di genere sulla base delle differenze morfologiche riscontrate a livello del tratto digerente e del poro escretore.

Sono state poi calcolate la prevalenza, l'intensità di infestazione ed il grado di abbondanza.

RISULTATI

In 581 soggetti esaminati, sono state rinvenute 9 larve appartenenti alla Famiglia Anisakidae. Tutti i soggetti parassitati presentavano non più di una larva ciascuno. Solamente una larva era non vitale.

I generi della famiglia Anisakidae riscontrati in *Illex coindetii* sono stati *Anisakis* ed *Hysterothylacium*, con rispettivamente 2 e 7 soggetti positivi. Considerando le differenti aree di campionamento, il comprensorio Spotorno-Arenzano è risultato quello con il maggior numero di soggetti positivi (6 Anisakidae, di cui 1 *Anisakis* e 5 *Hysterothylacium*). Nell'areale antistante l'isola d'Elba sono state ritrovate un totale di 3 larve appartenenti alla Famiglia Anisakidae, di cui 1 del genere *Anisakis* e 2 *Hysterothylacium*. I dati sono riassunti in Tabella 1.

Tabella 1. Soggetti positivi e numero di larve nelle varie aree di campionamento per quanto riguarda nematodi della Famiglia Anisakidae (F), genere *Anisakis* (A) e genere *Hysterothylacium* (H).

Località/ Distretto	Numero	Soggetti positivi			N. larve		
		F	A	H	F	A	H
Spotorno-Arenzano	341	6	1	5	6	1	5
Isola d'Elba	240	3	1	2	3	1	2
TOTALE	581	9	2	7	9	2	7

La prevalenza totale dei due generi è stata 0,3% per *Anisakis* e 1,2% per *Hysterothylacium*. La prevalenza totale riferita invece all'intera Famiglia Anisakidae è stata 1,5%. L'intensità d'infestazione totale è pari a 1,0 per quanto riguarda entrambi i generi e l'abbondanza 0,003 per *Anisakis*, 0,012 per *Hysterothylacium* e 0,015 per la Famiglia Anisakidae.

Prendendo in considerazione i diversi areali monitorati, nel comprensorio Spotorno-Arenzano è stata riscontrata una prevalenza dell'1,8% per quanto riguarda l'intera Famiglia Anisakidae, 0,3% per *Anisakis* e 1,5% per *Hysterothylacium*. Nell'areale antistante l'isola d'Elba la prevalenza è stata invece rispettivamente di 1,3%, 0,4% ed 1,2% (Tabella 2).

Tabella 2. Prevalenza (p), Intensità (i) e Abbondanza (a) nelle varie aree di campionamento per quanto riguarda nematodi della Famiglia Anisakidae (F), genere *Anisakis* (A) e genere *Hysterothylacium* (H).

Località/ Distretto	Prevalenza (p)			Intensità (i)			Abbondanza (a) (x 10 ⁻²)		
	F	A	H	F	A	H	F	A	H
Spotorno-Arenzano	1,8	0,3	1,5	1	1	1	1,8	0,3	1,5
Isola d'Elba	1,3	0,4	0,8	1	1	1	1,3	0,4	0,8
TOTALE	1,5	0,3	1,2	1	1	1	1,5	0,3	1,2

DISCUSSIONE

Il presente lavoro descrive per la prima volta la presenza di *Anisakis* in *Illex coindetii* pescati nel Mar Ligure, anche se tale parassita era già stato segnalato in questo cefalopode nell'Oceano Atlantico nord-orientale (1; 2; 6; 7), nel Mar Tirreno (4) e Mar Adriatico (8).

Considerando il genere *Anisakis*, le prevalenze osservate in questo studio sono decisamente inferiori a quelle segnalate per *Anisakis pegreffii* in Atlantico nord-orientale da Pascual *et al.* (10,6%) (6) e da Abollo *et al.* (11,0%) (1; 2), in Mar Adriatico da Petrić *et al.* (8) (30,5%) e in Mar Tirreno da Gestal *et al.* (4) (4,8 %).

La presenza in *Illex coindetii* del genere *Hysterothylacium*, parassita considerato non zoonotico, con prevalenze superiori a quelle di *Anisakis*, ci permette di sottolineare l'importanza di un'identificazione, almeno di genere, per quel che riguarda i nematodi della Famiglia Anisakidae isolati dai prodotti della pesca.

RINGRAZIAMENTI

Lavoro finanziato dal Ministero della Salute, con fondi di Ricerca Corrente 2009.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Abollo E., Gestal A., López A., González A.F., Guerra A. & Pascual S. (1998). Squid as trophic bridges for parasite flow within marine ecosystems: the case of *Anisakis simplex* (Nematoda: Anisakidae), or when the wrong way can be right. In "Cephalopod biodiversity, ecology and evolution". Payne A.I.L., Lipiński M.R., Clarke M.R. & Roeleveld M.A.C. (eds.), *South African Journal of Marine Science*, 20: 153-163.
- (2) Abollo E., Gestal C. & Pascual S. (2001). *Anisakis* infestation in marine fish and cephalopods from Galician waters: an updated perspective. *Parasitol. Res.*, 87: 492-499.
- (3) Clarke M.R. (1996). Role of cephalopods in the world's oceans. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B Biological Sciences*, 351: 977-1112.
- (4) Gestal C., Belcari P., Abollo E. & Pascual S. (1999). Parasite of cephalopods in the northern Tyrrhenian Sea (western Mediterranean): New host records and host specificity. *Scientia Marina*, 63: 39-43.
- (5) Lordan C., Burnell G.M. & Cross T.F. (1998). The diet and ecological importance of *Illex coindetii* and *Todarodes eblanae* (Cephalopoda: Ommastrephidae) in Irish waters. In: "Cephalopod biodiversity, ecology and evolution", Payne A.I.L., Lipiński M.R., Clarke M.R. & Roeleveld M.A.C. (eds.), *South African Journal of Marine Science*, 20: 153-163.
- (6) Pascual S., González A., Arias C. & Guerra A. (1995). Helminth infection in the short-finned squid *Illex coindetii* (Cephalopoda, Ommastrephidae) off NW Spain. *Dis. Aquat. Org.*, 23: 71-75.
- (7) Pascual S., González A., Arias C., & Guerra A. (1996). Biotic relationships of *Illex coindetii* and *Todaropsis eblanae* (Cephalopoda, Ommastrephidae) in the northeast Atlantic: evidence from parasites. *Sarsia*, 81: 265-274.
- (8) Petrić M., Mladineo I. & Krstulović Šifner S. (2011). Insight into the short-finned squid *Illex coindetii* (Cephalopoda: Ommastrephidae) feeding ecology: Is there a link between helminth parasites and food composition? *J. Parasitol.*, 97, 1: 55-62.
- (9) Sanchez P., Gonzalez F., Jereb P., Laptikhovsky V., Mangold K., Nigmatullin C. & Ragonese S. (1998). *Illex coindetii*. In "Squid recruitment dynamics: the commercial *Illex* species"; P.G. Rodhouse, E.G. Dawe & R.K. O'Dor (eds.), *FAO Fisheries Technical Paper* 376, FAO, Rome, Italy: 59-76.
- (10) Woo P.T.K. (2006). Phylum Nematoda. In: "Fish Diseases and Disorders. Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections", Second Edition; CABI Publishing: 417-443.

SUMMARY

In total, 581 short-finned squids, *Illex coindetii*, were sampled in the Ligurian Sea (North-western Mediterranean). The overall prevalences of genus *Anisakis* and *Hysterothylacium* were respectively 0.3% and 1.2% and the one of Family Anisakidae were 1.5%. The prevalences are lower when compared to those of other studies about this cephalopod in the northeastern Atlantic and Mediterranean sea. The present study shows how the consumption of this squid species from Ligurian Sea could not represent a high risk for human health.

IL PIANO DI SORVEGLIANZA SULLA CONTAMINAZIONE DA DIOSSINE IN REGIONE CAMPANIA: CRITERI DI ATTUAZIONE E MONITORAGGIO DELLE MATRICI ALIMENTARI

Esposito M.¹, Cavallo S.², Colarusso G.², Rosato G.³, Pellicanò R.², Serpe F. P.¹, Baldi L.^{1,2}

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Dipartimento di Chimica – via della Salute, 80055 Portici

²Osservatorio Regionale Sicurezza Alimentare, IZSM – via della Salute, 80055 Portici

³Regione Campania, Servizio Veterinario - Centro Direzionale Isola C/3, 80149 Napoli

Keywords: dioxin, milk, campania

SUMMARY

The Dioxins Monitoring Plan of Campania Region has been finalized to determine the levels and the extent of contamination by dioxin (PCDDs and PCDFs) and dioxin-like compounds (dl-PCBs) during three years (2008-2010). We report the criteria of this plan and results of dioxin analysis in milk and feed samples collected in Campania.

INTRODUZIONE

La produzione di latte bufalino e ovicaprio in Campania è destinata soprattutto alla filiera lattiero-casearia per cui la maggior parte transita in centri di raccolta e stabilimenti di trasformazione, spesso sotto forma di "latte di massa", che può risultare un ottimo indicatore dell'eventuale contaminazione da diossina.

Il termine "diossina" comprende policlorodibenzo-p-diossine (PCDD), policlorodibenzofurani (PCDF) e policlorobifenili diossina simili (dl-PCB) sostanze ubiquitarie, liposolubili, persistenti e altamente tossiche. Tra le fonti riconosciute di questi inquinanti, l'incenerimento illegale di rifiuti solidi urbani, agricoli e industriali è stato individuato quale causa principale della contaminazione di latte e derivati (mozzarella di bufala) emersa nel 2008 (1, 2). I roghi illegali spesso infatti hanno luogo in prossimità di campi destinati alla coltivazione di foraggi e presso allevamenti di bufali o bovini anche se la contaminazione potrebbe essere il risultato di errate pratiche agricole e zootecniche condotte dagli allevatori, per mancanza di adeguata formazione in materia.

Il Piano di Sorveglianza Diossine della Regione Campania nasce quindi dalla necessità di verificare lo stato della contaminazione utilizzando matrici alimentari (latte, mangime) oltre a quelle ambientali (terreno, acqua). In parallelo il piano ha promosso azioni di formazione e divulgazione, tra gli allevatori, delle Buone Pratiche Agricole e Zootecniche finalizzate a contenere i rischi della contaminazione.

Il Piano, della durata di tre anni, ha previsto, tra il 2008 e il 2010, la raccolta di campioni di latte e alimenti per uso zootecnico e la determinazione dei livelli di PCDD/F e dl-PCB. Successivamente il piano ha posto l'attenzione anche sui profili dei congeneri di PCDD/F e dl-PCB nelle diverse matrici analizzate, con lo scopo di individuare la probabile fonte di emissione (3,4). Il piano ha previsto inoltre la compilazione di questionari elaborati sulla base di indicazioni fornite dall'ISS e suddivisi in diverse sezioni che raccolgono, tra l'altro, informazioni relative a possibili sorgenti di emissione e fonti di esposizione, approvvigionamento idrico, composizione della mandria, tipo di alimenti somministrati agli animali, patologie riscontrate, tipologia di rifiuti presenti in azienda e modalità di smaltimento.

Scopo del presente lavoro è descrivere i criteri di attuazione del Piano di Sorveglianza e riportare i principali risultati ottenuti, per tracciare un quadro della contaminazione da diossine e dl-PCB in Campania.

MATERIALI E METODI

Ai fini della programmazione delle attività sono state utilizzate le mappe della distribuzione sul territorio regionale delle aziende bovine, bufaline e ovi-caprine, come da dati georeferenziati, e dei siti potenzialmente inquinanti (discariche, sversamenti non autorizzati, ecc.).

L'intero territorio regionale è stato suddiviso in settori quadrati con lato di 10 x 10 km, quindi sono stati presi in considerazione 120 settori tra quelli più significativi per presenza di patrimonio zootecnico lattifero (almeno 30 capi per le aziende bovine-bufaline e almeno 50 capi per quelle ovicaprine), nonché per presenza di attività potenzialmente inquinanti, escludendo quei settori con scarsa rappresentatività di entrambi. All'interno di ognuno di essi, con metodo random è stata sorteggiata un'azienda zootecnica tra quelle presenti in Banca Dati Nazionale (BDN).

Nel corso del campionamento, sono state anche raccolte informazioni sulle pratiche agricole e zootecniche mediante compilazione di apposite schede (check-list) nelle aziende, in particolare per quanto attiene all'alimentazione degli animali e alle eventuali fonti di contaminazione.

I anno - Campioni di latte

Oltre al sorteggio delle aziende è stato stabilito un calendario dei prelievi in modo da distribuirli in maniera uniforme nel corso dell'anno. In ognuna delle aziende sorteggiate è stato raccolto un campione di latte di massa per ricerca di PCDD/F e dl-PCB. Contestualmente al prelievo di latte è stata stilata una specifica check-list.

In caso di positività di un campione di latte, per superamento dei valori fissati dal Regolamento (CE) n. 1831/2006, è stato attuato il protocollo operativo previsto dalla normativa vigente per i casi di positività ai contaminanti ambientali, attivando il sistema di allerta come previsto dalla normativa vigente in tema di sicurezza alimentare. Il latte proveniente dalle aziende risultate positive è stato posto sotto sequestro e distrutto ai sensi del Regolamento (CE) n. 1774/2002.

II anno - Campioni di latte e alimento zootecnico

Oltre a 80 campioni di latte, sono stati prelevati circa 40 campioni di alimento zootecnico. Il campionamento è stato effettuato contestualmente a quello di latte prelevato nell'azienda zootecnica sorteggiata, prediligendo i foraggi di produzione aziendale o comunque locale.

In caso di positività dell'alimento zootecnico si è proceduto, alla sua distruzione e all'attivazione dell'allerta.

III anno - Campioni di latte e alimento zootecnico

Il piano di campionamento di latte ed alimenti zootecnici è stato ripartito in parti uguali, programmando, pertanto, 60 campioni di latte, presso aziende zootecniche che sono state individuate al termine delle risultanze delle attività dei primi due anni, e 60 campioni di alimento zootecnico. Questi ultimi sono stati suddivisi in parti uguali tra aziende zootecniche a vocazione lattifera ed operatori del settore dei mangimi (OSM) di cui agli elenchi in possesso delle Autorità ai sensi del Regolamento (CE) n. 183/2005.

Determinazione di diossine e PCB

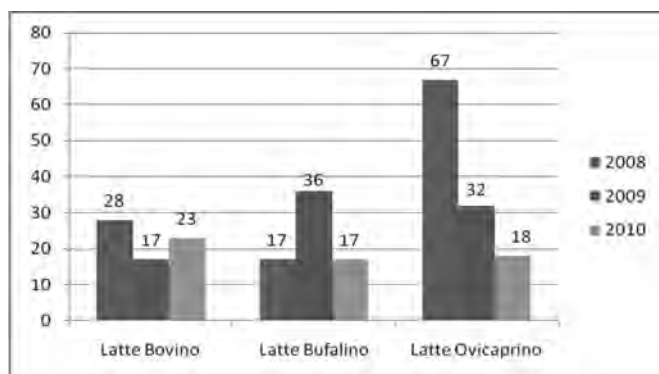
I campioni di latte e mangime sono stati prelevati dalle Autorità Veterinarie competenti per territorio, secondo i criteri previsti dal Reg. CE 1883/2006, e inoltrati all'IZSM per il successivo invio ai laboratori di competenza accreditati per la determinazione di PCDD/F e dl-PCB in gas-cromatografia/spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRGC/HRMS). Le analisi sono state effettuate dal laboratorio Eurofins GfA GmbH (Hamburg, D) e dal Laboratorio Nazionale di Riferimento dell'IZS di Teramo. Sono stati determinati quindi i 10 congeneri PCDD, i 7 PCDF e i 12 dl-PCB utilizzando i fattori di tossicità equivalente (WHO-TEF), fissati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità nel 1998, per determinare le tossicità equivalenti (WHO-TEQ) come previsto dalla specifica normativa.

Nel triennio 2008/2010 sono state compilate 137 check list. Le informazioni sono state messe in relazione agli esiti degli esami eseguiti sul latte per la ricerca di eventuali correlazioni tra la contaminazione del latte e particolari caratteristiche dell'allevamento oggetto di analisi. A tal fine è stato applicato un modello di regressione logistica avente come variabile dipendente l'esito degli esami del latte e come variabili esplicative le informazioni pervenute dalle check list.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nel primo anno di attività del piano è stata posta maggiore attenzione agli allevamenti ovicaprini dal momento che tali animali sono considerati dei buoni indicatori ambientali, grazie alla pratica del pascolo. Inoltre nel 2008 gli allevamenti bufalini, e in parte quelli bovini, sono stati campionati per la quasi totalità durante la concomitante emergenza diossina attraverso il Piano Straordinario di campionamento UE (3,4). Nel biennio successivo il numero di campioni è stato distribuito quasi equamente tra le diverse specie (figura 1).

Figura 1 – Tipologia e numero dei campioni di latte prelevati



Gli esiti delle analisi sono stati valutati rispetto ai limiti massimi stabiliti nel Regolamento CE 1881/2006 (latte: 3,0 pg-TE/g grasso per PCDD/F e 6,0 pg-TE/g grasso per la somma PCDD/F + dl-PCB) e la Raccomandazione della Commissione 88/2006 per quanto riguarda i livelli di azione (2,0 pg/g di grasso per latte e prodotti lattiero caseari).

Nei tre anni di attività del Piano su un totale di 255 campioni di latte analizzati ne sono risultati non conformi 6 (2,4%), corrispondenti a 5 allevamenti zootecnici suddivisi tra due bufalini, due ovicaprini e uno bovino. Altri 4 campioni non conformi erano costituiti da carni avicole prelevate in un'azienda situata in una zona a elevato rischio, con produzione destinata al consumo familiare.

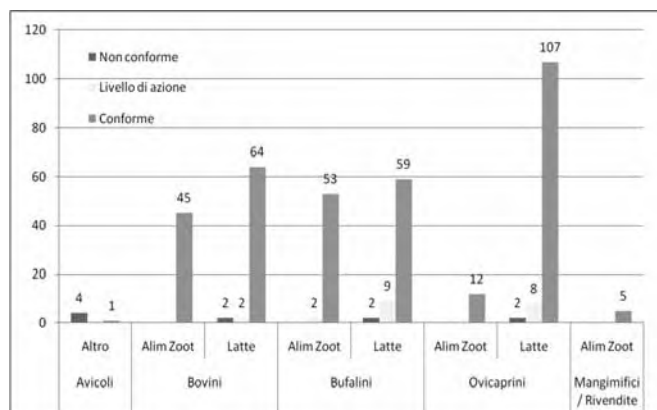
I dati ottenuti sul latte rivelano un andamento decrescente

per la contaminazione che già era stata riscontrata a livelli di allarme solo in una parte della regione. Di particolare interesse è proprio l'analisi della localizzazione degli allevamenti non conformi, infatti tutte le non conformità sono situate nella provincia di Caserta. Questo risultato ricalca e conferma gli esiti dei campionamenti effettuati per il Piano Straordinario UE che ha riconosciuto nella parte bassa della provincia di Caserta la zona più interessata dalla contaminazione da diossine.

Poiché il 90% della contaminazione da diossine negli animali arriva attraverso la via alimentare, particolare attenzione è stata posta soprattutto alle componenti elementari della razione alimentare e quindi all'alimento derivato direttamente da colture vegetali e sottoposto a insilamento o fienagione, ad esempio loietto, sorgo, avena, erba medica e mais, importante, quest'ultimo, soprattutto per le bufale per le quali rappresenta la quantità predominante della razione. Per quanto riguarda l'alimento zootecnico, i valori di riferimento sono quelli riportati nel D.M. 10 Gennaio 2007 (limite massimo 0.75 ng-TE/kg per i mangimi di origine vegetale).

Tutti i 117 campioni di alimento zootecnico prelevati nel triennio sono risultati conformi. Questi esiti, messi in relazione soprattutto alle non conformità riscontrate nel latte, evidenziano come la contaminazione degli animali sia avvenuta non solo in un periodo precedente, ma anche attraverso alimenti diversi da quelli che erano somministrati agli animali al momento del campionamento. Questa caratteristica è una delle principali criticità emerse relativamente agli alimenti zootecnici, altre riguardano ad esempio la difficoltà di rintracciare correttamente l'alimento presente in allevamento o nel tracciare il destino di colture foraggere investite dal fumo di incendi incontrollati.

Figura 2 - Distribuzione degli esiti



CONCLUSIONI

Il Piano di Sorveglianza Diossine della Regione Campania è stato finalizzato al controllo dell'entità e dell'estensione della contaminazione e all'individuazione dei punti da cui essa si origina ma anche alla riduzione e, dove possibile, all'eliminazione dei contaminanti nei mangimi prodotti in Campania e conservati negli allevamenti.

La valutazione dei profili di distribuzione dei congeneri di PCDD/F ha evidenziato come la fonte di contaminazione dei campioni prelevati nella provincia di Caserta si discosti da qualunque fonte di origine industriale, come può essere invece avvenuto in numerosi altri casi, ma sia imputabile piuttosto ad un incenerimento non corretto e incontrollato di rifiuti abbandonati, fenomeno legato alle numerose emergenze ambientali del

territorio. Per contro, è da sottolineare la costante assenza di contaminazione nelle altre province campane in particolare, per quanto riguarda il comparto bufalino, la provincia di Salerno. Infine, i risultati del Piano di Sorveglianza hanno mostrato che l'applicazione delle buone pratiche sia in campo agricolo che zootecnico, può significativamente ridurre la contaminazione dei mangimi e quindi l'ingresso di questi contaminanti nella catena alimentare, con particolare riferimento al latte, determinando una significativa riduzione del rischio legato alla presenza di diossine e PCB negli alimenti.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Borrello S. *et al.* Management of the 2008 Buffalo milk crisis in the Campania Region under the perspective of consumer protection. *Organohalogen compounds* 2008;70: 891-892.
- 2) Neugebauer F. *et al.* The Italian buffalo milk case - results and discussion of PCDD/F and DL-PCB analysis in milk, feeding stuff and soil samples from Campania, Italy. *Organohalogen Compounds* 2009; 71: 1203-1208
- 3) Esposito M. *et al.* *Chemosphere* 2010; 79: 341–348
- 4) Esposito M *et al.* *Chemosphere* 2009 77:1212–121.

VALUTAZIONE DEL RUOLO DEL SISTEMA CHEMOCHINICO CXCR4-SDF1 IN CARCINOMI MAMMARI CANINI E FELINI MEDIANTE ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA

Ferrari A., Petterino C., Florio T.¹, Barbieri F.¹, Purificato I.², Enache D.³, Tiso M., Campanella C., Vito G., Ratto A.

Centro di Referenza Nazionale per l'Oncologia Veterinaria e Comparata (CEROVEC) – Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte,

Liguria e Valle d'Aosta; ¹Laboratorio di Farmacologia, Dipartimento di Oncologia, Biologia e Genetica, Università degli Studi di Genova;

²Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma; ³National Sanitary Veterinary and Food Safety Authority (ANSVSA), Brasov.

Key words: carcinoma mammario, CXCR4, metastasi

SUMMARY - The aim of this work was the study of the role of CXCR4-SDF1 chemokinergic system in canine and feline mammary carcinomas and formation of metastases, as the histo-pathology of pet mammary tumours is similar to that in human breast cancer. Samples were collected by the National Reference Centre for Veterinary and Comparative Oncology (CEROVEC) of Genova. CXCR4 expression levels were evaluated by immunohistochemical analysis in 38 primary tumours and 7 metastases. In 4 metastases the expression was stronger than in primary lesions.

INTRODUZIONE - Lo scopo del presente lavoro è quello di studiare il ruolo del recettore CXCR4 nel carcinoma mammario di animali domestici e nella formazione di metastasi, mediante valutazione immunohistochemica dei livelli di espressione.

In particolare l'analisi è stata condotta su neoplasie di origine canina e felina, che mostrano numerose similitudini, sia istologiche che cliniche, con il tumore al seno nella donna.

I casi riportati sono stati raccolti presso il Centro di Referenza Nazionale per l'Oncologia Veterinaria e Comparata (CEROVEC), con sede a Genova.

Il sistema chemochinico costituito dal recettore CXCR4 ed il suo ligando SDF1 (fattore 1 di derivazione stromale), è coinvolto in molteplici processi cellulari tra cui l'infiammazione, l'organogenesi, l'ematopoiesi ed i meccanismi di difesa immunitaria.

L'attivazione di CXCR4 determina l'induzione di diversi effetti, tra cui l'adesione, la migrazione e la proliferazione cellulare. Recentemente, dati riportati in letteratura, hanno descritto la possibile associazione tra elevati livelli di espressione del recettore ed il potenziale metastatico (3).

A sostegno di tale ipotesi, alcuni studi *in vitro* hanno suggerito il coinvolgimento del sistema chemochinico CXCR4-SDF1 nei meccanismi di formazione di vasi sanguigni tumorali, ovvero nel processo angiogenetico (5). Inoltre, è stato riscontrato che inibitori di CXCR4, determinano una riduzione della chemiotassi e della migrazione cellulare, meccanismi alla base del processo di metastatizzazione.

A partire da tali premesse, l'identificazione del ruolo di CXCR4 nella tumorigenesi mammaria e nella formazione di metastasi consentirebbe lo sviluppo di terapie innovative che comprendano CXCR4 come target farmacologico.

MATERIALI E METODI - Lo studio è stato eseguito su 33 carcinomi mammari felini, (28 lesioni primitive e 5 metastasi, derivate da 23 gatte), e su 11 tumori maligni di origine canina (9 lesioni primitive e 2 metastasi).

I campioni sono stati fissati in formalina tamponata al 4% ed inclusi in paraffina. Le sezioni tissutali sono state colorate con il metodo standardizzato ematossilina-eosina per la diagnosi istopatologica secondo i criteri di classificazione internazionale WHO (World Health Organization).

Per l'analisi immunohistochemica è stato utilizzato un anticorpo anti-CXCR4, e REAL Envision Detection System Peroxidase/DAB+

(Dako). Le lesioni sono state analizzate al microscopio ottico per valutare la positività di reazione per il recettore CXCR4.

Parallelamente ai campioni, sono stati processati anche i controlli positivi (costituiti da tessuto di carcinoma mammario umano), ed i controlli negativi (ottenuti mediante sostituzione dell'anticorpo primario con BSA al 5% diluito in TBS).

Il valore di "staining index" (0,1,2,3) per CXCR4 è stato determinato per ogni campione tissutale prendendo in considerazione sia l'intensità di colorazione che la percentuale di cellule neoplastiche positive (1, 2).

RISULTATI - In 3 metastasi di tumore felino su 5 i livelli di staining index per CXCR4 sono risultati più elevati rispetto alla corrispondente lesione primitiva (Figure 1, 2).

Tra i carcinomi di origine canina, una metastasi ha mostrato un livello di espressione di CXCR4 maggiore rispetto al tumore.

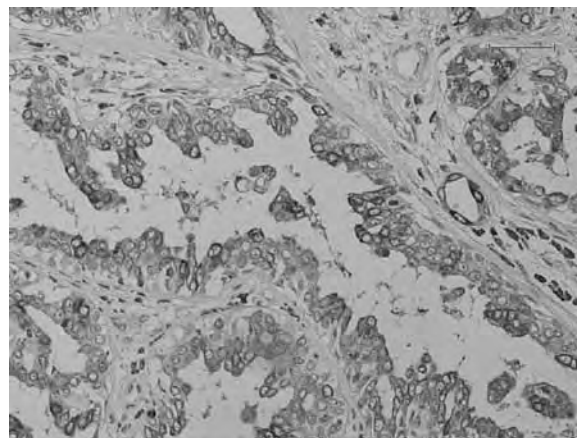


Figura 1. Carcinoma tubulopapillare primitivo: positività per CXCR4 (20X)

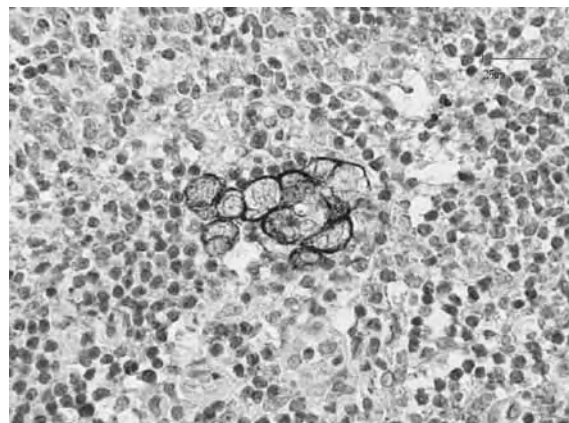


Figura 2. Carcinoma tubulopapillare, micro-metastasi linfonodale: intensa positività per CXCR4 (40X)

DISCUSSIONE - I risultati emersi da questo studio, dimostrano che CXCR4 è comunemente espresso nei carcinomi mammari di gatti e cani.

Inoltre, osservazioni preliminari mostrano immunopositività per CXCR4 più marcata nel tumore metastatico rispetto a quello primitivo, e supportano l'ipotesi del coinvolgimento di CXCR4 nei processi di invasività cellulare e di metastatizzazione.

Questi dati confermano il ruolo del sistema SDF1-CXCR4 nei tumori mammari maligni di cani e gatti, come riportato nei carcinomi umani.

L'espressione di CXCR4 nei carcinomi mammari è rilevante sia dal punto di vista biologico che terapeutico, poiché CXCR4 può rappresentare un nuovo target farmacologico. Infatti inibitori (ad esempio antagonisti recettoriali) della cascata del segnale attivata dall'interazione tra SDF1 e CXCR4, possono bloccare i meccanismi di proliferazione e migrazione tumorale (4).

In questo lavoro sono stati utilizzati il cane e il gatto, considerati attualmente, che rappresentano un ottimo modello di studio in oncologia comparata. Infatti, gli animali da compagnia, possono essere considerati "sentinelle" di diversi tipi di fattori ambientali potenzialmente lesivi per la salute animale e umana; in particolare il carcinoma mammario felino ed umano sono accomunati da aspetti biologici, clinici e farmacologici.

Lo studio di nuovi farmaci antitumorali, inclusi gli antagonisti di CXCR4, nei carcinomi mammari animali può quindi costituire un modello interessante per futuri studi pre-clinici traslazionali.

L'analisi dell'espressione di CXCR4 condotta in questo studio e l'approfondimento del suo ruolo nella patogenesi dei carcinomi mammari canini e felini costituisce la base per valutare il potenziale ruolo prognostico e terapeutico di questo recettore.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Liu Y, Ji R, Li J, Gu Q, Zhao X, Sun T, Wang J, Li J, Du Q, Sun B, 2010, Correlation effect of EGFR and CXCR4 and CCR7 chemokine receptors in predicting breast cancer metastasis and prognosis. *J Exp Clin Cancer Res*, 29:16.
2. Marlow R, Strickland P, Lee JS, Wu X, Pebenito M, Binnewies M, Le EK, Moran A, Macias H, Cardiff RD, et al, 2008. SLITs suppress tumor growth *in vivo* by silencing Sdf1/Cxcr4 within breast epithelium, *Cancer research*, 68:7819-7827.
3. Oonuma T, Morimatsu M, Nakagawa T, Uyama R, Sasaki N, Nakaichi M, Tamamura H, Fujii N, Hashimoto S, Yamamura H, Syuto B, 2003, Role of CXCR4 and SDF-1 in mammary tumor metastasis in the cat. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 2003, 65:1069-1073.
4. Pattarozzi A, Gatti M, Barbieri F, Wurth R, Porcile C, Lunardi G, Ratto A, Favoni R, Bajetto A, Ferrari A, Florio T, 2008, 17beta-estradiol promotes breast cancer cell proliferation-inducing stromal cell-derived factor-1-mediated epidermal growth factor receptor transactivation: reversal by gefitinib pretreatment. *Molecular pharmacology*, 73:191-202.
5. Strieter RM, Polverini PJ, Arenberg DA, Kunkel SL, 1995, The role of CXC chemokines as regulators of angiogenesis, *Augusta, Ga*, 4:155-160.

DNA COMET ASSAY: STUDIO DEI PRINCIPALI FATTORI DI INFLUENZA NELL'IDENTIFICAZIONE DI CARNI IRRADIAE

Floridi E., Siragusa G., Mangiacotti M., Marchesani G., Chiaravalle A. E.

Centro di Riferenza Nazionale per la Ricerca della Radioattività nel Settore Zootecnico-Veterinario, IZS Puglia e Basilicata, Foggia;

Key words: DNA Comet Assay, irradiated food, meat

ABSTRACT – The DNA Comet assay allows rapid, simple and sensitive detection of DNA degradation and can be used to control the overall quality of the food and to evaluate the damage caused by various chemical or physical treatments including ionizing radiations. In this paper has been studied the feasibility and applicability of the method to detect irradiated meat samples not yet validated at European level. Furthermore influencing factors on DNA comet assay performances such as time and storage conditions were also investigated.

INTRODUZIONE – Il DNA Comet Assay o gel elettroforesi su singola cellula (SCGE, single cell gel electrophoresis) fu introdotto per la prima volta da Ostling e Johanson nel 1984 come tecnica adatta per la visualizzazione diretta del danno al DNA in cellule individuali di pazienti sottoposti a radioterapia. Un esiguo numero di cellule sospese in un gel di agarosio su un vetrino da microscopio, vengono lisate da detergenti ed alte concentrazioni saline, e sottoposte ad elettroforesi, in condizioni di neutralità. Il DNA danneggiato, estratto dal nucleo durante la corsa elettroforetica, migra verso l'anodo conferendo alla cellula la morfologia caratteristica di una cometa. Le peculiari caratteristiche della SCGE indicano tale metodica come test di elezione per applicazioni generali in studi di danno e riparazione del DNA, monitoraggi di popolazioni umane, tossicologia genetica, biologia delle radiazioni e altri campi della ricerca scientifica.

Il DNA Comet Assay è stato modificato e trasformato in un metodo di screening per rilevare possibili frammentazioni del DNA presenti nelle cellule di alimenti sottoposti a trattamento radiante da Cerda H. e Delincee H. nel 1993 (1-2). L'irraggiamento può essere usato per rallentare i processi di maturazione e germinazione, per ridurre la carica microbica di batteri saprofiti ed inattivare batteri patogeni in prodotti deperibili ed in alimenti congelati aumentandone i tempi di conservazione e limitando significativamente i rischi per la salute umana. Vi è, inoltre, la necessità di migliorare il sistema dei controlli ufficiali da parte degli organi competenti per garantire il rispetto delle norme in materia di etichettatura, rafforzando la fiducia dei consumatori e garantendo allo stesso tempo il diritto di scelta. Il Comet assay è stato standardizzato a livello europeo come metodo EN 13784 ed in questo studio è stato testato su una varietà di matrici alimentari, non ancora validate a livello europeo. Il metodo è stato applicato come metodo di screening biologico per l'identificazione di carni irradiate di origine animale di diverse specie animali, sia fresche che congelate, anche a basse dosi, fino a tre mesi dopo l'irradiazione.

Non è tuttavia un metodo specifico per le radiazioni ed i risultati positivi devono essere confermati impiegando un metodo di conferma standardizzato che possa convalidare specificatamente l'avvenuto trattamento radiante su quel tipo di alimento. Sono stati condotti, in particolare, studi

sugli effetti della durata e delle condizioni di conservazione sulle performance del metodo, analizzando l'eventuale degradazione del DNA. Inoltre, questo metodo può essere utilizzato anche come indicatore di freschezza dei prodotti alimentari.

MATERIALI E METODI – Per una corretta esecuzione del test è necessario partire da una sospensione monocellulare. A tal fine il campione privato del grasso viene sminuzzato con un bisturi, trasferito in PBS (Phosphate buffered saline pH 7.4) freddo e omogeneizzato a freddo a 500 rpm per 5 minuti. La sospensione così ottenuta è filtrata prima attraverso un filtro a 500 micron e poi a 200 micron e lasciata sedimentare per 5 minuti. Le cellule vengono, quindi, sospese in una soluzione di agarosio Low Gelling Point (0,7% finale), successivamente trasferite su vetrini pretrattati con un sottile strato di agarosio (0,5% finale) e lisate con un detergente (SDS Sodium dodecylsulfate 2,5%) per rimuovere le membrane.

Dopo un breve periodo di condizionamento nel tampone TBE (Tris hydroxymethylaminomethane) si esegue la corsa elettroforetica al voltaggio di 2 V/cm, per due minuti a temperatura ambiente, durante la quale i frammenti di DNA vengono estratti dal nucleo.

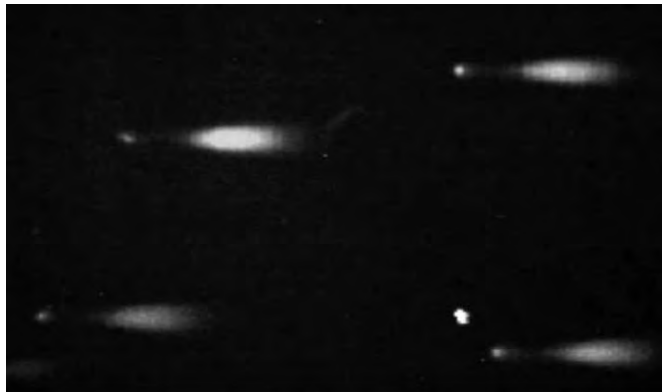
Il DNA migrato viene analizzato e quantificato utilizzando una soluzione colorante di arancio di acridina e misurandone l'intensità di fluorescenza al microscopio (mod. B-350 Optika). In presenza di DNA intatto si osserva un nucleo integro e fluorescente; nel caso in cui, invece, il DNA sia danneggiato, si verifica una migrazione di frammenti verso l'anodo, la cui immagine assume la morfologia di una cometa, dotata di coda più o meno estesa, a seconda del grado di danneggiamento del DNA. La lettura viene effettuata mediante un sistema di analisi dell'immagine computerizzato (Comet Score™), il quale fornisce informazioni quantitative relative alla intensità di fluorescenza emessa sia dalla testa che dalla coda, consentendo il calcolo immediato della percentuale di danno presente in ogni singola cellula.

I campioni delle diverse tipologie di prodotti carnei sono stati sottoposti a trattamento radiante con dosi nel range da 1 a 3 kGy con un irraggiatore a raggi X di bassa energia (Rad Source Inc., mod. RS-2400).

RISULTATI E DISCUSSIONE – Sono stati compiuti esperimenti in parallelo su matrici di tessuto muscolare animale di diverse specie (manzo, maiale, pollo e tacchino) e con il metodo DNA Comet assay è stata effettuata un'analisi quali-quantitativa, della forma, tipologia ed intensità di fluorescenza dei profili di comete identificati, al fine di valutare il diverso livello di degradazione del DNA e studiare gli effetti cellulari indotti in diverse condizioni di trattamento di irraggiamento e di conservazione delle matrici esaminate. Lo studio ha dimostrato che tutti i campioni irraggiati (nel range 1-3 kGy) producono un modello prevalente di cometa

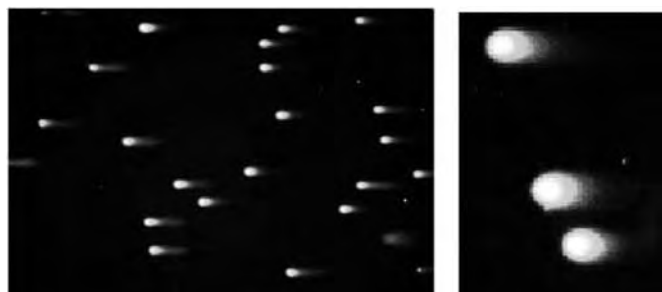
piuttosto omogeneo, con forme e dimensioni ben definite a seconda della dose di radiazioni applicata, in tutte le condizioni di conservazione analizzate (Fig.1).

Figura 1 - Carne di manzo -20°C irradiata a 3kGy, 10x



Con l'aumentare del livello di dose di esposizione si è registrato un incremento della distanza di migrazione dei frammenti di DNA in conformità con altri autori (3 - 4). Indipendentemente dalla specie del tessuto analizzato, in tutti i campioni irradiati, non è stata osservata alcuna cellula intatta, (assenza di falsi negativi) mentre i campioni di controllo, analizzati entro 24 h, hanno mostrato cellule integre ed isolate con un nucleo piuttosto omogeneo. (Fig. 2).

Figura 2 - Carne di maiale 1R non irradiata, 10x e 20x



Confrontando i tessuti analizzati in diverse condizioni di refrigerazione è stato rivelato che le carni rosse sono più resistenti di quelle bianche e risultano meno sensibili agli agenti degradativi. Tra le carni esaminate, quella di tacchino appare più delicata, la comparsa di prime comete è rilevabile già il primo giorno di studio. Anche in campioni di carne irradiati e conservati a -20°C e -80 °C, i profili delle comete sono caratterizzati da elevata omogeneità. I nostri risultati sperimentali hanno confermato l'applicabilità del Comet assay per rilevare gli alimenti irradiati non ancora validati a livello europeo, come il tacchino e dimostrano la capacità di tale metodo di distinguere tra alimenti trattati e campioni di controllo. Per approfondire ulteriormente la robustezza del metodo, è stata effettuata una serie di esperimenti in condizioni diverse variando due fattori: la durata e la temperatura di conservazione. In particolare, ogni campione è stato osservato per cinque giorni, tempo che corrisponde alla data di scadenza media del prodotto refrigerato. Una sintesi dei dati ottenuti sono riportati in tabella 1, insieme ai principali parametri quantitativi di analisi delle immagini.

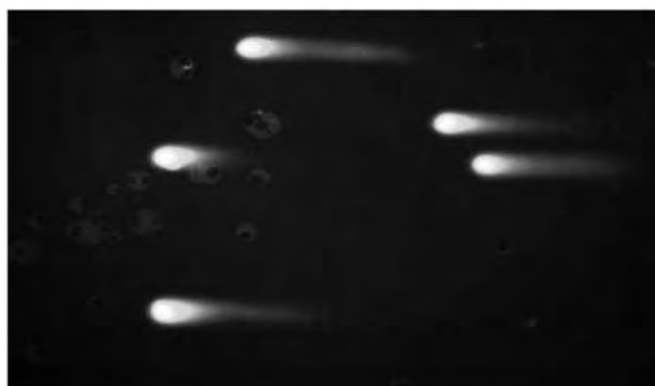
Tabella 1- Variazione dei parametri delle comete nel corso del tempo di conservazione a 4°C ± 2 in campioni non irradiati

		POLLO			TACCHINO		
		1R	3R	5R	1R	3R	5R
%HD ^a	M-SD	51±10	42±12	14±8	27±8	10±3	n.d. [†]
%TD ^b	M-SD	49±10	58±13	86±8	73±8	88±17	87±16
TM ^c	M-SD	29±20	52±40	226±32	80±20	118±52	106±30
		MAIALE			MANZO		
%HD ^a	M-SD	50±5	38±16	25±11	51±15	31±6	20±8
%TD ^b	M-SD	50±4	62±16	75±11	49±15	69±6	80±8
TM ^c	M-SD	33±10	23±53	163±45	56±48	106±18	190±32

^a%HD perc. di DNA nella testa; ^b%TD perc. di DNA nella coda; ^cTM tail moment
[†]not detectable

La verifica delle condizioni delle cellule alla data di scadenza ha evidenziato che mentre in carni bianche prevalgono code e comete (in tacchino solo code), nelle carni rosse le cellule isolate e senza scia sono poche, ma ancora presenti. Per essere più sicuri nella classificazione di campioni di carne irradiata è utile valutare l'effetto sul cambiamento del pattern di comete e di background in due differenti condizioni commerciali di conservazione: -20 e -80°C. Circa gli effetti della conservazione a -20°C, è stato rivelato che le carni bianche e la carne bovina mostrano un maggior numero di cellule isolate e con un nucleo piuttosto omogeneo anche se accompagnate da debole scia (Fig.3). La carne di maiale sembra più sensibile al congelamento perché il numero delle cellule isolate (con o senza scia) è approssimativamente uguale a quello delle comete; tuttavia mantiene inalterato il profilo per un mese. Le carni bianche invece dopo un mese dal congelamento subiscono una significativa degradazione del DNA ed il numero delle comete aumenta molto soprattutto nella carne di pollo pur rimanendo omogenee per forma ed intensità. Il modello di cometa è invece completamente trasformato nel caso del tacchino, dove compaiono solo comete prive di testa, nelle quali il nucleo è completamente degradato. Un veloce congelamento a -80°C, mantiene ancora intatto il tessuto, con una prevalenza di cellule molto bene isolate sia in campioni di carni bianche che rosse, con un "core" centrale ben visibile ed integro anche se non molto regolare tra di loro. Sono stati esaminati anche gli effetti dello scongelamento a 4°C, da due diverse temperature di partenza e a distanza di diverse ore: -20°C dopo 7h e 24h; -80°C dopo 24h e 48h. E' emerso che uno scongelamento lento da -20°C a 4°C in 7h è caratterizzato da un profilo cellulare simile al prodotto fresco con prevalenza di cellule intatte e di un nucleo omogeneo.

Figura 3 - Carne di manzo -20°C non irradiata, 20x



Nelle carni bianche, oltre alle cellule isolate, sono presenti anche comete piuttosto eterogenee, particolarmente evidenti in tessuto di tacchino il cui pattern cellulare è caratterizzato da sole code. Carni scongelate da a -20°C a 4 °C in 24 h, esibiscono una varietà di comete molto eterogenee tra loro ed un aumento della degradazione del DNA che è responsabile di un elevato livello di background sia nelle carni rosse che bianche. Profili cellulari simili con analogo background sono stati registrati in campioni congelati a -80°C e scongelati dopo 24h e 48h. In conclusione il presente lavoro conferma che il DNA Comet assay è un metodo semplice, sensibile ed efficace per individuare presenza di danno cellulare a livello di singole cellule. Oltre alla sua applicazione come metodo di screening per identificare rapidamente alimenti irradiati, i risultati di questo studio mostrano che il metodo può essere applicato con buone prospettive anche per valutare la freschezza del prodotto o la sua integrità. Infatti si è dimostrato un efficiente strumento per valutare il fenomeno di scongelamento o del processo di naturale degradazione che può verificarsi a seguito di cattive

condizioni di conservazione o di superamento della shelf life del prodotto.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- 1) Cerda, H., Delince, H., Haine, H., Rupp, H., 1997. The DNA "CometAssay" as a rapid screening technique to control irradiated food. *Mutat. Res.* 375, 167–181
- 2) Cerda, H., 1998. Detection of irradiated fresh chicken, pork and fish using the DNA Comet Assay. *Lebensm. Wiss. Technol.* 31, 89–92.
- 3) N. Marín-Huachaca, et al. 2005. Use of the DNA Comet Assay to detect beef meat treated by ionizing radiation, *Meat Science*, 446-450
- 4) M. M. Araújo, et al. 2004. Identification of irradiated refrigerated pork with the DNA comet assay, *Radiation Physics and Chemistry*, 185-187

Un ringraziamento a Rosario Accettulli e Guido Vegliante per la collaborazione ed il supporto tecnico.

INDAGINI MOLECOLARI PER L'IDENTIFICAZIONE DI CEFALOSPORINASI A SPETTRO ESTESO IN *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ISOLATI DA CANI E GATTI

Franco A., Amoroso R., Bruni G., Cordaro G., Di Matteo P., Donati V., Feltrin F., Lorenzetti S., Onorati R., Zini M., Battisti A.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni di Lazio e Toscana, Direzione Operativa Diagnostica Generale, Centro di Referenza Nazionale per l'Antibioticoresistenza, Via Appia Nuova 1411, 00178 Roma

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, Extended-spectrum beta lactamases, companion animals

ABSTRACT

In this paper we report the occurrence of resistance to Expanded-Spectrum Cephalosporins (ESCs), in *Klebsiella pneumoniae* from dogs and cats in Rome, Italy, over a five-year period (June 2006-June 2011).

Three major ampC-like and Extended-Spectrum β -lactamase genes (CMY-2, SHV-12 and CTX-M) are reported for the first time in *K. pneumoniae* from necropsy lesions and clinical samples from dogs and cats in Italy. Expanded-Spectrum Cephalosporins are considered a last resort in the therapy of invasive infection by Enterobacteriaceae in animals and humans, and are included among Critically Important Antimicrobials for human therapy (WHO, 2008). Molecular characterization demonstrates the presence of several combination of β -lactamases genes in *K. pneumoniae* from companion animals.

INTRODUZIONE

Klebsiella pneumoniae è un agente patogeno della Famiglia delle Enterobacteriaceae che in Medicina Veterinaria è con maggior frequenza implicato in casi di mastite nei bovini, di batteriemia e setticemia nei vitelli, di metrite negli equini, polmonite e setticemia nei puledri, di polmonite e infezioni del tratto urinario nei cani (3). In Medicina umana è frequentemente associato a polmoniti, infezioni conseguenti a ferite o interventi chirurgici, infezioni urinarie, infezioni invasive e setticemie, meningiti, poliartriti in età infantile, sia a livello di community che ospedaliero. E' sempre più frequente in infezioni umane il riscontro di *K. pneumoniae* con resistenze a varie classi di antibiotici, comprese cefalosporine a spettro esteso (ESC).

MATERIALI E METODI

Tra giugno 2006 e giugno 2011 sono sottoposti ad accertamenti diagnostici 3585 campioni di 1254 cani e 1223 campioni di 364 gatti da lesioni rilevate in sede di necropsia o da forme cliniche, presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Sede Centrale di Roma. Gli isolati riferibili a *Klebsiella spp* sospetti sono stati sottoposti ad identificazione fenotipica attraverso test biochimici differenziali, anche miniaturizzati (Sistema API 20E, bioMérieux, Craponne, France). Gli isolati di *K. pneumoniae*, sono stati sottoposti a test di sensibilità ai chemioantibiotici secondo Standard Internazionali (CLSI) (2).

Gli isolati che con il test di screening presentavano un profilo fenotipico compatibile con ESBL sono stati sottoposti al test di conferma fenotipico secondo standard CLSI.

La conferma genotipica è avvenuta mediante saggio di PCR per classi di geni *bla*CTX-M, *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*OXA e, qualora ritenuto opportuno, *bla*AmpC (1).

RISULTATI

Dei 55 isolati di *K. pneumoniae* identificati, (45 da campioni provenienti da cani e 10 da campioni provenienti da gatti) 41 provenivano da animali con batteriemia/setticemia (rispettivamente 32 su 45 isolati da cani e 9 su 10 isolati da gatti).

Tra questi, 15 su 55 (27%) di cui 11 su 45 da cani (24%) e 4 su 10 da gatti (40%) di *K. pneumoniae* hanno mostrato fenotipo riferibile ad ESBL. Dodici isolati sono risultati positivi per più di un determinante di ESC-resistenza.

Di queste 7 su 15 sono risultate contemporaneamente positive per *bla*CTX-M, *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*OXA (vedi tabella 1)

DISCUSSIONE

Viene riportata la presenza di isolati *K. pneumoniae* produttori di ESBLs da lesioni o forme cliniche in animali da compagnia e l'identificazione dei determinanti genetici coinvolti.

In relazione alla possibile origine di ESBLs in cani e gatti è opportuno ricordare che vi è stato un uso off-label abbastanza diffuso di cefalosporine di terza generazione registrate per uso umano nella terapia degli animali da compagnia che risale agli inizi degli anni novanta, ancor prima quindi del loro utilizzo nella pratica degli animali da reddito, dove tuttora è limitato a casi selezionati per evidenti ragioni di tipo economico (1). Più recentemente, sono state registrate varie specialità per uso veterinario a base di cefalosporine di 3° e 4° generazione, alcune delle quali per animali da compagnia (e tra esse anche molecole con caratteristiche di lunga permanenza nell'organismo). I risultati di questa sorveglianza passiva rivestono un'importanza significativa in Sanità Pubblica Veterinaria poiché l'uso estensivo e non prudente di alcune classi di antibiotici di particolare rilevanza nella terapia umana producono pressione selettiva sulle popolazioni microbiche delle specie animali oggetto di terapia e favoriscono l'emergenza e la diffusione di cloni di agenti di infezione resistenti e di determinanti di resistenza verso antibiotici di importanza critica in Medicina Veterinaria e Umana (Critically Important Antimicrobials).

Tale condizione può esitare nella diminuzione dell'efficacia di classi di antibiotici considerate "last resort" nella terapia delle infezioni invasive o generalizzate negli animali ed in caso di trasferimento ed infezione nell'uomo, rappresentare un serio problema terapeutico.

BIBLIOGRAFIA:

- 1) Carattoli A., Lovari S., Franco A., Cordaro G., Di Matteo P., and Battisti A. 2005 Extended -spectrum β -Lactamases in *Escherichia coli* isolated from Dogs and Cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 833-835
- 2) CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Document M31-A, Wayne, Pennsylvania, USA.
- 3) D. E. Roberts, H. M. McClain, D. S. Hansen, P. Currin, E. W. Howerth. An outbreak of *Klebsiella pneumoniae* infection in dogs with severe enteritis and septicemia. *J Vet Diagn Invest* 12:168-173 (2000).

Tabella 1: Caratteristiche molecolari degli isolati di *Klebsiella pneumoniae* resistenti, 2006-2011.

Progressivo	Anno	AmpC	CMY-2	CTX-M	SHV	TEM	OXA-1
1	2006	+	+	-	+	-	-
2	2006	-	-	+	+	-	-
3	2008	-	-	+	+	+	+
4	2008	-	-	-	+	-	+
5	2008	-	-	-	+	-	-
6	2008	-	-	-	+	-	-
7	2009	-	-	+	+	+	+
8	2009	-	-	+	+	+	+
9	2010	-	-	+	+	+	+
10	2010	-	-	+	+	+	-
11	2010	-	-	-	+	+	-
12	2010	-	-	+	-	-	-
13	2011	-	-	+	+	+	+
14	2011	-	-	+	+	+	+
15	2011	-	-	+	+	+	+

SHV: SHV variants; TEM: TEM variants; CTX-M: CTX-M variants

INDAGINE SULLA DIFFUSIONE DI MALATTIE SOSTENUTE DA VIRUS, BATTERI E PARASSITI IN CINGHIALI PROVENIENTI DALLA CAMPANIA E CALABRIA

¹Fusco G.,¹Buonanno M.,¹Aprea G.,²Veneziano V., ¹D'Alessio N.,¹Cozzolino L.,¹Pugliese A. M.,
¹Marati L.,¹Di Prisco F.,¹Galiero G.,¹Guarino A.,

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno; Dipartimento di Sanità Animale; Unità Operativa Complessa Virologia.

²Università degli Studi di Napoli Federico II, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Patologia e Sanità Animale

Keywords: cinghiali, malattie virali, parassitarie e batteriche

ABSTRACT

Sera from 65 wild boars were collected from Campania e Calabria regions and tested for antibodies to virus of swine vesicular disease, pestivirus, Aujeszky disease, Hepatitis E, swine influenza, to bacteria *Brucella* spp. and protozoa (*T. gondii*). Inspection by artificial digestion of diaphragm muscle from 33 animals was carried out to *Trichinella* spp.; in the muscles were performed bacteriological analysis to *Salmonella* spp. and *E. coli*. Of the 65 serum tested, 4 (6.1%) were positive for Aujeszky and 29 (44.6%) to HEV. Seven (10.8%) were positive to *T. gondii*. All sera were negative for swine vesicular disease, pestivirus, swine influenza and *Brucella* spp.. All diaphragm muscles were negative to *Trichinella* spp., *Salmonella* spp and *E. coli*.

INTRODUZIONE

Ad oggi, se si esclude l'autoconsumo da parte del cacciatore, il Regolamento CE 853/2004 prevede l'immissione sul mercato delle carni di selvaggina di grossa taglia come il cinghiale solo se la carcassa dopo l'abbattimento è manipolata presso centri di lavorazione della selvaggina riconosciuti. Occorre evidenziare che, negli ultimi anni l'interesse del mondo scientifico per il cinghiale è in crescente aumento in quanto il numero di esemplari presenti sul territorio nazionale nel tempo è cresciuto in maniera esponenziale, tanto da determinare in alcune regioni quali Toscana, Umbria e Campania veri e propri casi di "emergenza cinghiale". A ciò si aggiunge che questo ungulato selvatico svolge un ruolo rilevante come serbatoio nell'epidemiologia di alcune importanti malattie infettive e parassitarie degli animali del comparto zootecnico e dell'uomo (1,2). Di recente sono stati attivati numerosi piani di controllo per il contenimento di questo selvatico in molte province ed il compito di ridurre il numero dei cinghiali circolanti è stato affidato a cacciatori autorizzati e formati denominati selecontrollori la cui attività venatoria determina la produzione di un quantitativo considerevole di carne. Anche se una parte di questo alimento è destinato all'autoconsumo, è ragionevole ipotizzare che non tutto il quantitativo di cacciagione possa essere utilizzato dal cacciatore stesso per autoconsumo. Per evitare l'immissione della carne di cinghiale sulle tavole dei consumatori senza adeguati controlli sanitari ed in considerazione del fatto che questo alimento presenta caratteristiche organolettiche e nutritive eccellenti, numerose amministrazioni locali ed enti pubblici, impegnati nella gestione dell'emergenza cinghiale, hanno messo in essere progetti al fine di poter utilizzare le carni provenienti dall'abbattimento di questa specie attraverso la creazione di una "filiera carne cinghiale". Per tale ragione nel presente studio abbiamo ritenuto interessante investigare sullo stato sanitario dei cinghiali provenienti dall'attività venatoria selettiva svolta in regione Campania e dei cinghiali

provenienti da una azienda faunistica da ripopolamento della regione Calabria.

Alla luce di quanto sopra riferito e considerato il ruolo di *reservoir* svolto dai selvatici, nella fattispecie il cinghiale, sulla sanità pubblica veterinaria e umana, è utile conoscere l'eventuale circolazione di alcuni agenti infettivi nella popolazione di cinghiali autoctoni selvatici nonché di quelli allevati a scopo di ripopolamento. Dal momento che le carni di questo animale possono essere consumate dall'uomo, è interessante ricercare non solo gli agenti infettivi responsabili di malattie del suino come Influenza suina, Peste Suina classica (PSC), Malattia Vescicolare Suina (MVS), Malattia di Aujeszky, alcune delle quali sottoposte a controllo nei Piani nazionali di eradicazione, ma anche agenti zoonotici riconosciuti responsabili di malattia alimentare nell'uomo. Il possesso dei corretti requisiti igienico sanitari per la produzione e successiva immissione sul mercato delle carni è requisito indispensabile ai fini della sicurezza alimentare, pertanto oltre alla *Trichinella* spp, nematode ricercato ai sensi del Regolamento CE 2075/2005, i campioni sono stati esaminati per *Salmonella* spp, *E. coli*, *T. gondii*, *Epatite E* (HEV), *Brucella* spp.

MATERIALI E METODI

2.1 Campionamento

Nel periodo compreso tra ottobre 2010 e ottobre 2011 sono stati esaminati 65 campioni di emosiero di cinghiali (33 provenienti dall'attività venatoria prevista nel piano di gestione del cinghiale nel Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano in regione Campania e 32 provenienti da una azienda faunistica della regione Calabria).

2.2 Controlli sierologici

Per la ricerca degli anticorpi diretti verso il virus dell'epatite E è stato utilizzato il kit immunoenzimatico ID Screen HEV in direct-multispecies commercializzato dalla IDVET. I micropozzetti sono sensibilizzati con un antigene ricombinante del capsido del genotipo 3 HEV. La ricerca degli anticorpi anti MVS è stata eseguita con il test ELISA distribuito dal CERVES secondo il protocollo indicato dal medesimo CdRN (Centro di Riferenza Nazionale). La ricerca degli anticorpi diretti verso il virus della malattia di Aujeszky è stata eseguita con il kit immunoenzimatico HERD Chek Pseudorabies Virus GPI commercializzato dalla IDEXX.

La ricerca degli anticorpi anti PSC è stata eseguita mediante il kit immunoenzimatico fornito dal CEREP. Infine la diagnosi di brucellosi è stata eseguita con i metodi convenzionali secondo il protocollo del CdRN e utilizzando i reagenti previsti dalla normativa che regola i piani di risanamento della brucellosi degli animali domestici sul territorio nazionale. Per la ricerca dell'Influenza suina è stata impiegata la metodica di inibizione dell'emoagglutinazione, seguendo il protocollo

del CdRN c/o l'IZS di Padova. Sono stati ricercati gli anticorpi diretti verso i sottotipi H1N1 e H3N1.

2.3 Controlli parassitologici

La ricerca della *Trichinella* spp. è stata eseguita secondo le indicazioni stabilite dal Regolamento (CE) n° 2075 del 2005. L'indagine è stata effettuata su 33 campioni di muscolo diaframma di cinghiali abbattuti a seguito dell'attività dei selecontrollori nel Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano. La ricerca degli anticorpi anti *T. gondii* è stata eseguita con il test immunoenzimatico ID Screen Toxoplasmosis Indiretto Multi-species commercializzato dalla IDVET. I sieri sono stati esaminati seguendo il protocollo indicato dalla ditta produttrice. I micropozzetti della piastra sono adesi con antigene P30 specifico di *T. gondii*.

2.4 Controlli microbiologici

Le metodiche utilizzate, per la ricerca di *Salmonella* spp. e il conteggio di *E. coli* sono state rispettivamente UNI EN ISO 6579: 2004 e ISO TS 16649-2:2001.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati ottenuti nel presente studio illustrati nella tabella sottostante, sebbene riferiti ad un numero non elevato di campioni, risultano interessanti e per questo richiedono doverose considerazioni. In dettaglio nella tabella si riportano i dati delle indagini eseguite sui campioni distinti per regione. Abbiamo ritenuto opportuno suddividere i campioni a seconda della provenienza perché i risultati ottenuti nell'ambito dei due gruppi, riguardo alle prevalenze riscontrate per determinati parametri, non sono sovrapponibili. La principale ragione è da attribuirsi alla dinamica dell'infezione legata alla via di trasmissione degli agenti eziologici oggetto dell'indagine. Ne sovviene di conseguenza che le condizioni di vita dei capi esaminati sono rilevanti nell'epidemiologia delle malattie ed è importante sapere se il soggetto è un selvatico vissuto allo stato brado oppure è stato allevato. A tale riguardo mettiamo subito in evidenza la positività riscontrata nei sieri di cinghiale al virus dell'Epatite E. Su 65 capi esaminati, 29 risultano positivi (44,6%). Questo dato sembra allarmante ma nei fatti dei 29 capi positivi, 25 provenivano dalla azienda faunistica e 4 risultavano selvatici. La maggiore prevalenza della malattia in soggetti allevati è facilmente spiegabile ed è dovuta al fatto che la principale via di trasmissione del HEV è quella oro-fecale e avendo gli animali condiviso gli stessi ambienti, abbeveratoi nonché medesime condizioni di allevamento, questi elementi, associati a elevata densità dei soggetti, giustificano ampiamente il numero considerevolmente elevato di soggetti positivi e la diffusione della malattia nel gruppo degli esaminati. Ad ogni modo anche il dato ottenuto nei cinghiali selvatici di 4 capi positivi su 33 esaminati (12,1%), conferma la diffusione del virus nella popolazione dei cinghiali selvatici che secondo Kaci e colleghi è infetta da oltre 10 anni (3). Alcuni autori condividono l'ipotesi che l'infezione nel cinghiale è precedente all'infezione del suino. Riguardo ai rimanenti controlli virologici, tutti i capi esaminati sono risultati negativi per MVS, PSC ed Influenza suina. Diversamente 4 campioni dei 33 sieri esaminati appartenenti al gruppo dei cinghiali selvatici hanno presentato anticorpi verso l'antigene *Pseudorabies Virus GPI (PRV-GPI)* mentre nessun suide allevato ha mostrato positività alla malattia di Aujeszky. Questo dato indica la diffusione del PRV nell'ambiente dei selvatici e ciò grazie all'elevata resistenza

che il virus presenta quando non esposto direttamente alla luce solare, conseguentemente si conferma il rischio di introduzione della malattia negli allevamenti suinicoli. Si valuta perciò vincente la strategia d'azione intrapresa nell'attuale Piano nazionale di controllo della malattia negli allevamenti della specie suina che si basa sulla vaccinazione con vaccino spento deleto non solo dei soggetti all'ingrasso e riproduttori ma, in via sperimentale, anche dei riproduttori con vaccino attenuato deleto (7). La ricerca degli anticorpi anti *Brucella abortus* e *B. melitensis* è risultata negativa in tutti i campioni, così come la ricerca di *Trichinella* spp.. Infine, 7 sieri appartenenti al gruppo dei cinghiali selvatici sono risultati positivi a *T. gondii*. Riguardo a quest'ultimo dato, questo protozoo è notoriamente responsabile di aborto nelle donne gravide e nascita di bambini con gravi disturbi neurologici (4). La principale via di contagio è quella orale attraverso l'assunzione di carni crude o poco cotte ed in particolare carne di suino o cinghiale ed agnello (5). In merito al rischio zoonotico e alla possibilità di contrarre una malattia attraverso l'assunzione di alimento, merita particolare attenzione e considerazione anche l'epatite virale E. Questa malattia è presente in forma endemica in Paesi in via di sviluppo e nei Paesi industrializzati sono stati diagnosticati casi di persone che si sono ammalate al ritorno da viaggi in Paesi a rischio. In ogni caso, oltre agli episodi descritti, sono stati registrati riscontri di positività nell'uomo non associabili al passaggio attraverso Paesi a rischio ma piuttosto ad abitudini alimentari come il consumo di salsicce e bacon crudi. Questi casi rafforzano l'ipotesi che si tratti di una zoonosi emergente. In conclusione, l'attuale normativa vigente prevede ai fini della sicurezza alimentare l'obbligo di assicurare al consumatore un prodotto sano. Questa disposizione comporta per tutti gli addetti che operano nel settore della sicurezza alimentare l'obbligo di attivare sistemi in grado di soddisfare siffatta richiesta. Considerando che il cacciatore consuma personalmente assieme ai propri familiari la carne dell'animale cacciato e può cedere una carcassa/anno/persona, è ragionevole pensare che il solo controllo di *Trichinella* prevista dall'attuale normativa non è sufficiente dal momento che questo tipo di alimento rappresenta senza dubbio un rischio per la salute pubblica. Sarebbe opportuno predisporre obbligatoriamente un piano di controllo delle carni dei selvatici abbattuti nell'ambito dell'attività venatoria e durante l'attività dei selecontrollori anche per il solo autoconsumo. Il predetto piano dovrebbe prevedere oltre alla ricerca dei patogeni normalmente ricercati negli alimenti, anche agenti come *T. gondii* e HEV e ciò al fine di dare pieno riscontro alla norma che obbliga alla tutela della salute del consumatore finale. Questo controllo è quanto mai opportuno se pensiamo che oggi l'Epatite E è considerata una malattia emergente ed alcuni episodi di epatite acuta umana sono stati chiaramente attribuiti al consumo di carne di suino e cinghiale poco cotta (6).

BIBLIOGRAFIA

- 1) Meng X.J., Lindsay D.S., Sriranganathan N. 2009. Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. Phil. Trans. R. Soc. B 364, 2697-2707.
- 2) Ruiz Fons F, Segales J., Gortazar S.. 2008 A review of viral diseases of the European wild boar: effects of population dynamic and reservoir role. The Veterinary Journal 176, 158-169.

3)Kaci S., Nokler K. and John R. 2008. Detection Epatitis E virus in archived German wild boar serum sample. Veterinary Microbiology 128, 380-385.

4)Dubey JP., 2000. Sources of *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. Until rates of congenital toxoplasmosis fall, control measures are essential. British Medical Journal 312, 127-128.

5)Surveillance and monitoring of *Toxoplasma* in humans, food and animals. The EFSA Journal, 2007, (583), 1-64.

6)Martelli F., Caprioli A., Zengarini M., Marata A., Fiegna C.,

Di Bartolo I., Ruggeri F., martin M., Delogu M., Ostanello F. 2008 Detection of hepatitis E virus (HEV) in a demographic managed wild boar (*Sus scrofa scrofa*) population in Italy. Veterinay Microbiology, (126) 74-81.

7)Decreto del 30 dicembre 2010 "Modifiche ed integrazioni al decreto del 1° aprile 1997 recante il Piano nazionale di controllo della Malattia di Aujeszky nella specie suina" pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana - serie generale n°35 del 12/02/2011.

Tabella - Risultati dei controlli sierologici, batteriologici e parassitologici eseguiti sui cinghiali della Campania e Calabria

Malattia	N° campioni pos/esaminati (prevalenza %)		
	Campania	Calabria	Totale
MVS	0/33	0/32	0/65
PSC	0/33	0/32	0/65
Aujeszky	4/33 (12,1%)	0/32	4/65 (6,1%)
HEV	4/33 (12,1%)	25/32 (78,1%)	29/65 (44,6%)
Toxoplasmosi	7/33 (21,2%)	0/32	7/65 (10,8%)
Brucellosi	0/33	0/32	0/65
Trichinellosi	0/33	-	0/33
Salmonellosi	0/33	-	0/33
Colibacillosi	0/33	-	0/33

NOROVIRUS IN MOLLUSCHI BIVALVI: COMPETENZE E CONOSCENZE TRA STUDENTI E MITILICOLTORI

Galleggiante Crisafulli A.¹, Vitale N.¹, Rubineti F.¹, Serracca L.², Ercolini C.², Chiavacci L.¹, Barbaro A.¹

¹ S.S. Osservatorio Epidemiologico, Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino;

² Laboratorio di Microbiologia Marina sezione La Spezia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta

Key words: Norovirus, shellfish, risk prevention

Parole chiave: Norovirus, molluschi bivalvi, prevenzione del rischio

SUMMARY

Noroviruses (NoV) are recognized as the leading cause of acute gastroenteritis worldwide. Shellfish consumption has always been one of the major risk factors for Norovirus infection, especially when these products are eaten raw or slightly cooked. The aim of this work was to evaluate the knowledge on virological risk associated with the BMS production. Was create a questionnaire of 16 closed questions, was then given a 20 personnel of shellfish production, during training interventions on virological risk and to 24 university students that in the future could be at work in this field.

The questionnaire results showed a different kind of preparation among the respondents with respect to knowledge about Norovirus.

INTRODUZIONE

I Norovirus (NoV), appartengono alla famiglia dei *Caliciviridae* e sono riconosciuti come la principale causa di infezioni gastroenteriche acute non batteriche nell'uomo.

I sintomi della malattia si manifestano dopo un periodo di incubazione di 12-48 ore e comprendono nausea, vomito, diarrea e crampi addominali, e scompaiono nel giro di 1 o 2 giorni. L'infezione si trasmette per via oro fecale, tramite l'ingestione di alimenti e acque contaminati, attraverso le particelle di aerosol, ma anche per contatto con superfici e oggetti contaminati, in particolar modo negli ambienti comunitari (navi da crociera, mense scolastiche, ospedali).

I molluschi eduli lamellibranchi bivalvi (MEL), sono considerati gli alimenti maggiormente coinvolti nella trasmissione di Norovirus, soprattutto per il modo in cui vengono abitualmente consumati. Essi infatti spesso vengono mangiati crudi o cotti fino all'apertura delle valve (1).

I MEL, infatti essendo animali filtratori, sono suscettibili alla contaminazione da parte dei Norovirus e sono capaci di concentrare alte cariche all'interno dell'epatopancreas.

Durante il picco della malattia, attraverso il vomito e le feci, vengono liberate particelle virali in elevata quantità, che contaminano l'ambiente per cui la bassa carica infettante (da 10 a 100 particelle virali) e l'elevata resistenza nell'ambiente esterno, infatti sopravvivono alle alte temperature e ai comuni disinfettanti, contribuiscono notevolmente al rischio di contagio (2). La cottura al vapore fino all'apertura delle valve, l'aggiunta di limone e l'elevata salinità dell'acqua di mare non costituiscono metodi di depurazione dei mitili. Può contribuire all'eliminazione del virus, il mantenimento prima della vendita in vasche dello stabulatore contenenti acqua ozonizzata.

Per prevenire la diffusione, è bene osservare le comuni norme igieniche personali e nella manipolazione di cibi e bevande, nonché consumare i molluschi bivalvi ben cotti.

Il presente lavoro ha avuto lo scopo di valutare le conoscenze relative al rischio virologico associato al consumo ed alla produzione di molluschi eduli lamellibranchi (MEL) tra gli addetti

del settore produttivo e tra studenti universitari che in futuro potrebbero trovarsi a lavorare in questo campo.

MATERIALI E METODI

E' stato formulato un questionario costituito da 16 domande a risposta chiusa (con 3 risposte predefinite); 6 domande volte a valutare le conoscenze generiche sui norovirus, 5 domande sull'importanza dei mitili nella diffusione della malattia e 5 domande sulle principali pratiche di bonifica e prevenzione.

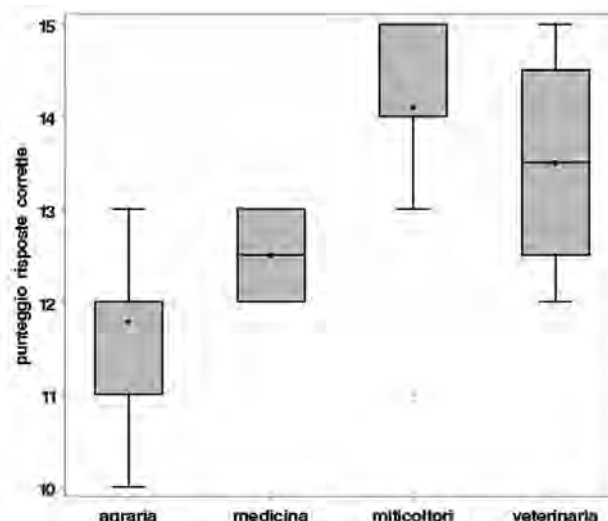
Il questionario è stato somministrato in forma anonima a 44 soggetti nell'ambito di giornate formative sul rischio virologico legato al consumo di molluschi bivalvi che si sono tenute a febbraio 2011. Il campione di comodo era costituito da due gruppi ovvero addetti al settore produttivo della molluschicoltura di La Spezia (N=20) e studenti (N=24) di diverso grado di formazione di cui 8 specializzandi in Medicina Veterinaria, 2 in Igiene e Medicina Preventiva (Facoltà di Medicina) e 14 della facoltà di Agraria (Corso di Biosicurezza e Qualità Alimenti).

I dati dei questionari sono stati poi inseriti in un database *ad hoc* per le successive analisi statistiche. Per valutare la corretta conoscenza degli argomenti per ogni soggetto è stato calcolato un punteggio. Il punteggio ottenuto dai soggetti è stato confrontato per categoria utilizzando l'analisi della varianza a una via con l'applicazione della Proc GLM del software SAS®.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nessuno degli intervistati ha risposto in modo corretto a tutte e 16 le domande, 9 (20.45%) soggetti hanno risposto correttamente a 15 domande. Il boxplot mostra la distribuzione delle risposte corrette per tipologia di intervistato.

Grafico 1. Il box plot mostra la distribuzione del numero di risposte corrette per tipologia di intervistato. Sull'asse delle X la tipologia e sull'asse delle Y il punteggio



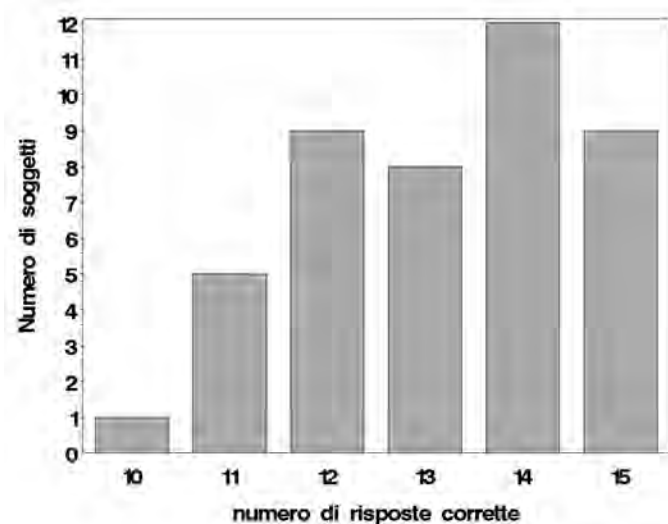
Il grafico evidenzia una certa variabilità nel numero di risposte corrette tra le diverse tipologie di soggetti intervistati. L'analisi della varianza (ANOVA) è risultata statisticamente significativa (test $F=15.83$; $p>0.0001$); indice che, la differenza nel punteggio medio osservata tra i gruppi non è casuale.

I confronti tra gruppi calcolati con il test del range di Student e di Tukey, hanno mostrato una differenza statisticamente significativa nel punteggio ottenuto da mitilicoltori e studenti di agraria, evidenziando una migliore preparazione dei primi rispetto ai secondi.

I dati relativi al questionario hanno evidenziato una buona conoscenza generale del problema da parte degli intervistati (grafico 2), tuttavia l'analisi statistica ha mostrato una differenza tra le risposte date dal campione di studenti e dagli addetti al settore, sottolineando una migliore preparazione da parte dei mitilicoltori rispetto agli studenti. (grafico 1)

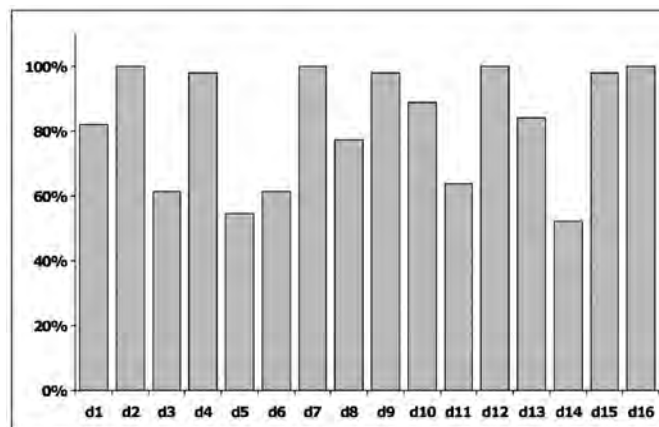
Confrontando le risposte corrette date dagli studenti per singola facoltà e dai mitilicoltori è emerso che gli studenti di agraria hanno dato il minor numero di risposte corrette. (grafico1).

Grafico 2. Sull'asse delle X è rappresentato il numero di risposte corrette, sull'asse delle Y il numero dei soggetti intervistati che ha dato le risposte corrette.



Tutti i soggetti hanno risposto correttamente a domande inerenti: i sintomi della malattia, la modalità di trasmissione e misure preventive. La domanda meno conosciuta era quella sulla efficacia dell'ozonizzazione come metodo per l'eliminazione del virus dalle cozze contaminate. (grafico3).

Grafico 3. Il grafico raffigura la percentuale di risposte corrette per domande. Sull'asse delle X le domande sull'asse delle Y la percentuale di risposte corrette



I risultati del questionario hanno evidenziato una differente preparazione tra le tipologie di intervistati rispetto alle conoscenze relative a Norovirus. In particolare il campione di studenti ha dimostrato una migliore conoscenza sulle caratteristiche generiche del virus, mentre i mitilicoltori conoscono meglio l'importanza dei mitili nella diffusione della malattia e le principali pratiche di bonifica e prevenzione.

BIBLIOGRAFIA

1. Koo HL, Ajami N, Atmar RL, DuPont HL. (2010). Noroviruses: The leading cause of gastroenteritis worldwide. *Discov Med.* 10 (50):61-70. Review.
2. Koopmans M., Duizer E. (2004). Foodborne viruses: an emerging problem. *International Journal of Food Microbiology*, 90:23-41.

INDAGINE EPIDEMIOLOGICA A SEGUITO DI MTA IN PIEMONTE - GIUGNO 2011

Gallina S.^{1§}, Bianchi D. M.^{1§}, Bellio A.^{1*}, Civalleri N.^{1*}, Serra R.², Zaccaria T.², Gulino M.³, Maggi C.³, Decastelli L.^{1*}¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino, Italy^{1§}NRL Stafilococchi coagulasi positivi compreso *S. aureus*; ^{1*}S.C. Controllo Alimenti e Igiene delle Produzioni;²S.C. Microbiologia AOU S. Giovanni Battista, Torino, Italy;³S.C. Igiene degli Alimenti e della Nutrizione ASL TO5**Keyword:** *S. aureus*, enterotossine stafilococciche, MTA**SUMMARY**

In June 2011 a foodborne outbreak occurred in Piedmont Region. 50 people took part to a dinner in a private house: few hours after the meal, some guests showed gastroenteric symptoms and 8 of them were conducted to the hospital. Epidemiological investigation allowed the collection of food (meal residual) and biological samples (vomit, faeces and nasal swab).

S. aureus was isolated from biological samples by microbiological methods. Strains were analyzed for the presence of specific genes for staphylococcal enterotoxins and compared with PFGE.

Analyses allowed to identify the strain isolated from the nasal swab of one of the cook as the source of this outbreak.

INTRODUZIONE

Molti ceppi di *S. aureus* e di altri stafilococchi coagulasi positivi, tra i quali *S. intermedius* e *S. hyicus*, sono in grado di produrre esotossine. Le enterotossine stafilococciche (ES) sono termoresistenti in quanto resistono a temperature molto elevate (100°C per circa 1 ora) e sono spesso causa di tossinfezioni di origine alimentare (MTA). Gli alimenti maggiormente implicati in casi di MTA da ES sono i prodotti lattiero caseari in quanto il latte può veicolare *S. aureus*. Altra fonte di contaminazione per gli alimenti è rappresentata dall'uomo, poiché *S. aureus* può colonizzare cute e mucose delle prime vie aeree ed essere trasferito agli alimenti mediante manipolazione e aerosol.

Il rispetto delle Buone Pratiche di Lavorazione (GMP) e Igieniche (GHP) è fondamentale durante le fasi di lavorazione degli alimenti sia a livello industriale che casalingo.

Il lavoro descrive un caso di tossinfezione alimentare da enterotossine stafilococciche verificatosi durante una cena in casa privata.

MATERIALI E METODI

Nella sera del 19 giugno 2011, 8 persone con sintomi gastroenterici (vomito e diarrea) si sono presentate presso il Pronto Soccorso dell'Ospedale Maggiore di Chieri (TO).

I pazienti riferivano di aver partecipato ad una cena presso abitazione privata alla quale erano presenti in totale 47 commensali. La sintomatologia era comparsa dopo circa 2 ore dall'inizio della cena.

A seguito della segnalazione di sospetta MTA da parte del Pronto Soccorso dell'Ospedale Maggiore di Chieri, il personale reperibile del Servizio Igiene degli Alimenti e Nutrizione (SIAN) dell'ASL TO5 ha avviato l'indagine epidemiologica, la richiesta della ricerca dei microrganismi sospettati di essere causa di MTA sui campioni biologici dei pazienti sintomatici e le procedure per il campionamento dei residui del pasto. Il menù era costituito da numerose portate: tuttavia gli alimenti ancora disponibili al momento del campionamento erano i seguenti:

- Torta di asparagi
- Insalata di mele, sedano e maionese
- Mousse di capperi
- Lasagne di verdura
- Salsa per vitello tonnato
- Fesa di tacchino

I campioni sono stati prelevati ed inviati presso il Laboratorio Controllo Alimenti dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (IZS PLV) di Torino per le analisi microbiologiche riportate in tabella 1.

Tabella 1. Analisi microbiologiche su alimenti

ANALISI	METODO
Stafilococchi coagulasi positivi	ISO 6888-2
<i>Bacillus cereus</i>	ISO 7932
<i>Clostridium perfringens</i>	ISO 7937
Salmonella spp	ISO 6579
Enterotossine stafilococciche	Metodo EU RL
Tossina diarroica <i>B. cereus</i>	Metodo Interno

Da 4 pazienti ospedalizzati si sono prelevati campioni biologici, quali vomito e feci, che sono stati inviati presso il di Laboratorio della S.C. Microbiologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria San Giovanni Battista di Torino. Inoltre, nei giorni successivi, i 2 addetti alla preparazione del pasto ed i 2 addetti alla somministrazione si sono resi disponibili per l'esecuzione di un tampone nasale.

I ceppi di *S. aureus* isolati dai campioni biologici e dal tampone nasale sono stati inviati al Laboratorio Nazionale di Riferimento (NRL) per gli Stafilococchi coagulasi positivi compreso *S. aureus*, con sede presso l'IZSPLV. Qui, mediante l'applicazione del metodo per il rilevamento dei geni codificanti per le enterotossine (1 e 2), messo a punto dal Laboratorio Comunitario di Riferimento (EU-RL CPS), si è valutata la presenza dei geni codificanti le ES.

Inoltre i ceppi sono stati inviati all'EU-RL CPS presso l'ANSES di Maisons Alfort Francia, per la caratterizzazione molecolare mediante protocollo in elettroforesi in campo pulsato (PFGE): il metodo prevede l'impiego dell'enzima di restrizione *SmaI* e, attraverso l'analisi dei profili mediante BioNumerics® Software (Applied Maths), consente di ottenere un profilo elettroforetico utile al confronto dei ceppi isolati.

RISULTATI

Le analisi microbiologiche sui residui del pasto hanno mostrato, per tutti gli alimenti, una concentrazione di Stafilococchi coagulasi positivi inferiore al limite di rilevazione del metodo: inoltre, nessuna altra positività significativa è stata riscontrata nei campioni alimentari.

Sui campioni biologici dei 4 commensali sono state eseguite le ricerche dei patogeni enterici compatibili con le caratteristiche dell'epidemia di gastroenterite, con i risultati riportati in tabella 2.

Tabella 2. Analisi microbiologiche su campioni biologici

Paziente - campione	<i>C.perfringens</i> enterotossina	<i>S.aureus</i> coltura	<i>B.cereus</i> coltura	<i>Salmonella</i> coltura
1-vomito	-	Positivo	Negativo	-
2-vomito	-	Positivo	Negativo	-
3-vomito	-	Positivo	Negativo	-
3-feci	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
4-feci	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo

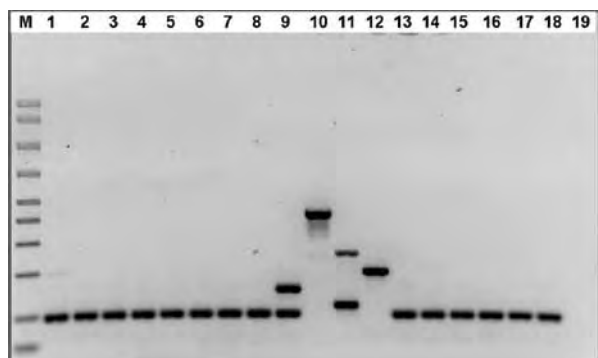
La ricerca di *S.aureus* nel tampone nasale di 3 dei 4 addetti alla preparazione o somministrazione del pasto è risultata positiva. Le analisi in PCR hanno mostrato per i 14 ceppi isolati dai campioni biologici dei pazienti la presenza degli stessi geni codificanti ES (*sea* e *sei*) (Fig. 1 e 2); i ceppi isolati dai tamponi nasali dei 3 addetti sono risultati positivi rispettivamente per i seguenti geni codificanti ES:

Addetto 1: *seg*, *sei* e *sep*;

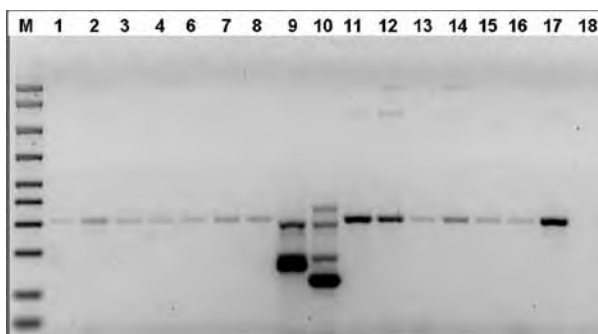
Addetto 2: *seh*;

Addetto 3: *sea* e *sei*.

La figura 3 mostra la corsa elettroforetica in campo pulsato delle restrizioni dei 14 ceppi isolati dai materiali biologici dei pazienti e dal tampone dell'addetto 3. Il pattern ottenuto è sovrapponibile e l'analisi dei profili di restrizione indica che il grado di omologia tra i ceppi è pari al 100%.

Figura 1. Multiplex PCR per la rilevazione dei geni *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* e *ser*

Lane M: Marker 50-2.000 bp; Lane 1-8 e Lane 13-18: *S.aureus* da campioni biologici; Lane 9-12 C+; Lane 19 C-

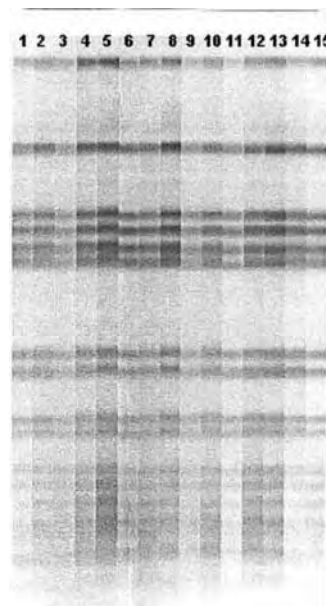
Figura 2. Multiplex PCR per la rilevazione dei geni *seg*, *seh*, *sei*, *sej* con *sep*

Lane M: Marker 50-2.000 bp; Lane 1-8 e Lane 11-17 *S.aureus* da campioni biologici; Lane 9-10 C+; Lane 18 C-

DISCUSSIONE

Le analisi microbiologiche eseguite sui residui del pasto non hanno permesso di isolare il ceppo di *S.aureus* responsabile della tossinfezione. Tuttavia, è necessario ribadire che solo

alcuni degli alimenti costituenti il menu della cena erano disponibili al momento del prelievo; inoltre, per alcune portate, la quantità di alimento reperita ha limitato la preparazione di un campione significativo in sede analitica. Pertanto, appare plausibile che il veicolo del ceppo responsabile della sintomatologia possa essere un alimento non più disponibile per il prelievo, o che la scarsa quantità di matrice analizzata abbia diminuito la sensibilità dei metodi applicati.

Figura 3. Gel di corsa elettroforetica in campo pulsato (PFGE)

Lane 1-14 *S.aureus* da campioni biologici; Lane 15 *S.aureus* da tampone nasale addetto 3

La possibilità di confrontare, mediante tecniche di biologia molecolare, i ceppi di *S.aureus* isolati dai campioni biologici dei pazienti e dal tampone nasale dei cuochi, ha permesso di identificare uno di questi ultimi quale fonte della contaminazione. Infatti, il protocollo in PCR e l'applicazione della PFGE hanno permesso, non solo di evidenziare che i ceppi isolati sono portatori dei medesimi geni codificanti le ES (*sea* e *sei*), ma anche di appurare che il loro grado di omologia è pari al 100%, appartenendo quindi al medesimo pulstipo.

In conclusione, si può affermare che l'indagine epidemiologica attivata in seguito a questo episodio, associata all'utilizzo di idonee metodiche analitiche, non solo ha portato alla conclusione del caso, ma ha anche dimostrato l'importanza dell'applicazione, durante la manipolazione industriale e domestica degli alimenti, di GMP e GHP per ridurre il rischio di contaminazione e garantire una maggiore qualità igienico-sanitaria degli alimenti.

Si sottolinea infine, in caso di MTA, l'importanza dell'indagine eziologica parallela in campioni di origine alimentare e umana e del coordinamento della corretta e tempestiva raccolta degli stessi ai fini dell'interpretazione dei risultati.

BIBLIOGRAFIA

1. Detection of genes encoding staphylococcal enterotoxins. Multiplex PCR for **sea** to **see** and **ser**. Method of the EU-RL CPS, Version 1, October 2009
2. Detection of genes encoding staphylococcal enterotoxins. Multiplex PCR for **seg** to **sej** and **sep**. Method of the EU-RL CPS Version 1, October 2009

VERIFICA DEL POTENZIALE BATTERIOCIINOGENICO DEL LACTOCOCCUS LACTIS subsp. CREMORIS

Galuppini E., D'Amico S., Bertasi B., Berta V., Panteghini C., D'Ippolito N., Varisco G.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Reparto di Tecnologia Acidi Nucleici Applicata agli Alimenti, Brescia

Key words: bio-scavengers, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, bacteriocins, *Listeria monocytogenes*

SUMMARY

The aim of this work was the development an effective method for the extraction of bacteriocines from the liquid cultures of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Furthermore, in vitro testing the final product extraction to verify the presence and efficacy/efficiency of potential bacteriocins produced by lactic versus *Listeria monocytogenes* (LM)

INTRODUZIONE

In tempi recenti, la sempre maggiore richiesta di freschezza dei prodotti e di informazione sulle condizioni dell'alimento hanno stimolato lo sviluppo del cosiddetto imballaggio funzionale, il quale è in grado di interagire con il prodotto alimentare o con l'ambiente circostante all'interno della confezione, ai fini di prolungare la conservabilità o mantenere o migliorare le condizioni dei prodotti alimentari imballati. Alcune regole applicabili ai materiali e oggetti attivi e intelligenti sono state stabilite nel Regolamento (CE) N. 1935/2004 e nel Regolamento (CE) N. 450/2009. Il tale ambito vengono presi in considerazione i biodecontaminanti, sostanze che possono trovarsi in un contenitore separato o essere direttamente incorporate nel materiale di imballaggio.

Le batteriocine sono molecole anfifiliche, caratterizzate da una sintesi a livello ribosomiale e dotate di attività inibitoria (litica-lisogenica) nei confronti di alcuni batteri patogeni gram positivi e gram negativi.(1) La porzione del genoma che codifica per la produzione delle batteriocine da parte dei batteri lattici, può essere contenuta sia a livello plasmidico che a livello cromosomico (2); tale produzione può avvenire spontaneamente oppure in seguito ad una stimolazione operata da agenti ambientali, fisici o chimici. Queste molecole possono essere differenti tra loro e sono state suddivise da Kleanhammer in base alla loro natura chimica e al loro spettro di azione in 4 classi: Classe I o "lantibiotici": peptidi attivi sulle membrane cellulari (nisina, lattaccina 481, lattococcina S e carnocina U149); Classe II: peptidi di piccole dimensioni, (pediocina Ach/PA-1, lattococcina A, B, M, Leucocina A, Sakacina A, P e Curvacina A); Classe III: peptidi di grandi dimensioni (superiori ai 30 kDa) e termolabili (Helveticina J, Helveticina V-1829, Acidofilina A, Lattacina A e B); Classe IV: proteine complesse associate a porzioni di tipo glucidico e lipidico (Plantaricina S, Peucocina S, Lattacina 27e Pediocina SJ-1)(3). La 'purificazione' di tali sostanze ha riscosso crescente interesse, in particolare per il possibile impiego in campo alimentare come bioconservanti, per contenere l'eventuale crescita di batteri patogeni responsabili di patologie gastroenteriche o di deterioramento della matrice alimentare. Attualmente esiste a tale scopo una grande varietà di prodotti chimici utilizzati dall'industria per la conservazione degli alimenti, che potenzialmente possono però determinare effetti tossici; per tale motivo i produttori si stanno indirizzando verso la ricerca di sostanze additive alternative di origine naturale come le batteriocine. Recenti studi scientifici hanno dimostrato che alcuni ceppi di batteri lattici sono forti produttori di batteriocine; tra questi il *Lactococcus lactis*, che in condizioni opportune (se presenta materiale plasmidico codificante per batteriocine), produce

molecole di classe I ovvero lantibiotici.(4) Tale microrganismo è presente naturalmente in diverse matrici alimentari di origine lattiero-casearia quali alcuni formaggi, yogurt e latti fermentati. Lo scopo del seguente lavoro è stato la messa a punto di un metodo efficace per l'estrazione di batteriocine dal terreno di crescita culturale del *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e la valutazione in vitro del prodotto finale dell'estrazione per verificare la presenza e l'efficacia delle eventuali batteriocine, prodotte dal lattico verso la *Listeria monocytogenes*.

MATERIALI E METODI

MICROORGANISMO: *Lactococcus lactis* subspecie *cremoris*, isolato da formaggio tradizionale a pasta cotta (Silter), successivamente caratterizzato mediante tecnica ARDRA e confermato mediante ribotipizzazione automatica (RIBOPRINTER)(5).

FASE ESTRATTIVA Il metodo utilizzato per l'estrazione di batteriocine dal terreno culturale prevedeva diverse fasi:

- 1) crescita del *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in MRS Broth e parallelamente un controllo positivo con aggiunta di Nisina standard (concentrazione 1 mg/ml) e un controllo negativo;
- 2) eliminazione delle cellule mediante centrifugazione;
- 3) aggiunta di cloroformio (1:2) al sovrantante e successiva agitazione su piastra per 20 minuti.
- 4) centrifugazione a 10400 x g per ottenere la suddivisione in tre fasi: fase acquosa, pellet e solvente organico.
- 5) eliminazione della fase acquosa, sospensione del pellet in tris buffer e ulteriore centrifugazione a 12100 x g per agevolare la separazione dal cloroformio.
- 6) la soluzione ottenuta è stata riscaldata su piastra fino all'ottenimento di un precipitato bruno.
- 7) 0,5 g di precipitato sono stati risospesi in 1 ml di tris buffer e utilizzati per la verifica dell'inibizione della crescita della *Listeria monocytogenes*.(6)

VERIFICA DELL'INIBIZIONE DELLA CRESCITA DI LISTERIA MONOCYTOGENES

Al fine di verificare il potere batteriocinogenico del *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e l'efficacia del metodo di estrazione, sono state allestite 5 aliquote di *Listeria monocytogenes* preventivamente cresciuta in terreno BHI a 37°C, identificate come L1, L2, L3, L4, L5. Da ogni aliquota sono state effettuate 7 diluizioni seriali (in base 10) in soluzione fisiologica; successivamente seminati per spatolamento su piastre di agar sangue (crescita over night a 37°C).

In seguito, si è così proceduto:

- nell'aliquota L1 è stata aggiunta soluzione fisiologica: CONTROLLO DI CRESCITA NEGATIVO (L1T);
- nell'aliquota L2 è stato aggiunto il PRECIPITATO DERIVANTE DAL CONTROLLO NEGATIVO DI ESTRAZIONE (L2T);
- nell'aliquota L3 è stata aggiunta Nisina non estratta ed ha rappresentato il CONTROLLO DI CRESCITA POSITIVO (L3T);
- nell'aliquota L4 è stata aggiunta Nisina estratta ed ha rappresentato il CONTROLLO POSITIVO DI ESTRAZIONE (L4T);

- nell'aliquota L5 è stato aggiunto il precipitato derivante dalla brodocoltura *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ESTRATTO (L5T).

Tutte le preparazioni sono state poste in agitazione costante per 16-18 ore e successivamente 100 µl di ogni sospensione e relative diluizioni sono stati seminati per spatolamento su piastre di agar sangue (crescita over night a 37°C), per poter quantificare la *Listeria* dopo ogni trattamento.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Dopo incubazione overnight delle piastre (37°C) è stata effettuata la conta delle colonie di *Listeria monocytogenes* (L1,L2,L3,L4,L5) prima e dopo trattamento (L1T,L2T,L3T,L4T, L5T). I risultati ottenuti vengono riportati nei grafici sottostanti (in logaritmi) :

Grafico 1



Grafico 2



Grafico 3

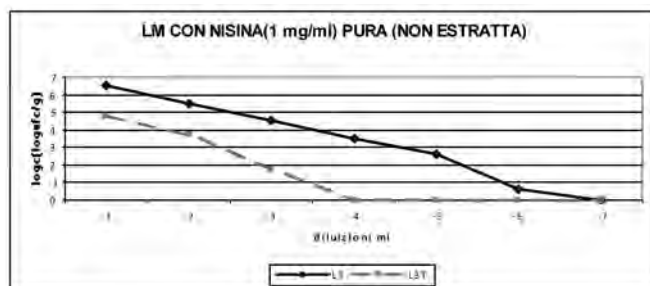


Grafico 4

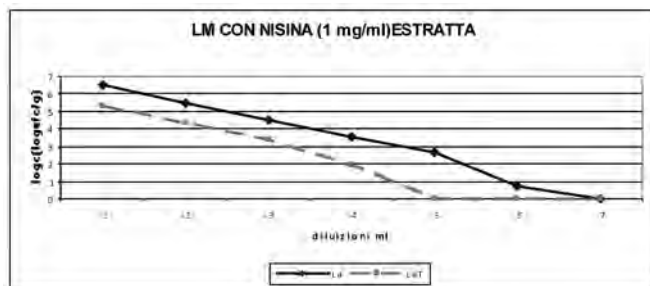
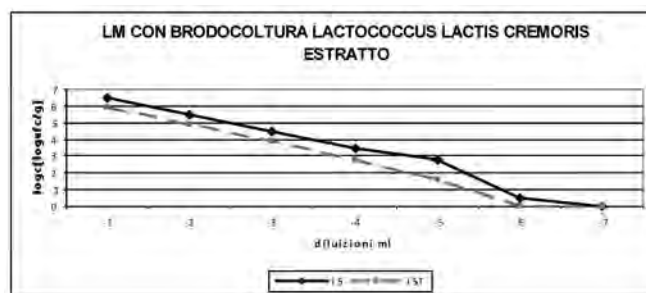


Grafico 5



Nella tabella seguente, vengono riassunte le differenze prima e dopo il trattamento di *Listeria monocytogenes* rilevate in tutte le diluizioni in tutti i 5 trattamenti.

Il metodo estrattivo utilizzato per questo lavoro è stato scelto sulla base delle caratteristiche anfifiliche proprie delle batteriocine: il cloroformio è immiscibile in acqua ed ha alta affinità per i lipidi quindi permette l'estrazione e la concentrazione da un terreno acquoso.

	-1	-2	-3	-4	-5	-6	MEDIA valori
L1-L1T	0	0	0	0	0	0	0
L2-L2T	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	3.12	Aumento LM 1.87 log
L3-L3T	-1.3	-1.7	-2.9	-3.5	-2.6	-0.6	Diminuzione LM 4.4 log
L4-L4T	-1.2	-1.2	-1.2	-1.6	-2.6	-0.7	Diminuzione LM 1.4 log
L5-L5T	-0.6	-0.6	-0.6	-0.7	-1.2	-0.5	Diminuzione LM 0.7 log

Nel grafico 1 si può notare che le curve di crescita della *Listeria monocytogenes* prima e dopo trattamento con soluzione fisiologica sono completamente sovrapponibili; questo indica che il batterio patogeno non subisce alcuna variazione nella fase di verifica dell'inibizione della crescita. Il grafico 3 invece indica il reale potere inibitorio dello standard di Nisina (1 mg/ml) puro utilizzato in questo esperimento dove si nota una sostanziale inibizione della *Listeria* dopo trattamento.

I risultati ottenuti suggeriscono che il metodo estrattivo utilizzato, permette di concentrare non solo batteriocine ma anche alcuni elementi nutritivi presenti nel terreno, che contribuiscono a un notevole aumento della *Listeria monocytogenes* dopo il trattamento (graf.2). Questo è un parametro da tenere in considerazione per la valutazione del potenziale batteriocinogenico del *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* il quale sembra avere un effetto sulla *Listeria* tale da diminuirne la crescita dopo trattamento di 0.7 logaritmi (grafico 5); considerando l'effetto dovuto alla presenza di altri elementi estratti dal terreno, difficile da eliminare totalmente, la resa del sistema potrebbe essere maggiore. Le performance del metodo per l'estrazione delle batteriocine sembrano promettenti per un'eventuale utilizzo del sistema al fine di produrre soluzioni per contenere/prevenire la presenza di *Listeria* nelle preparazioni alimentari e per essere

utilizzata come possibile additivo nella realizzazione di imballaggi funzionali. Ulteriori prove eseguite con altri ceppi e con altri patogeni saranno necessarie per confermare la reale possibilità di applicazione di questo sistema.

BIBLIOGRAFIA

- 1) V.Raffi, M.C.Ossiprandi (2006) "Bacteriocins: Evolution, Ecology and practice application" Ann.Fac.Medic.Vet. di Parma (Vol XXVI) 235-246.
- 2) M.A. Daeschel, T.R. Klaenhammer (1985) "Association of 13.6-megadalton plasmid in pediococcus pentosaceus with bacteriocin activity" Appl. Environ.Microbiol. 50,1538-1541.
- 3) T.R. Klaenhammer (1993) "Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria" FEMS Microbiology. Rev. 12, 39-86.
- 4) I.Moreno, L.S.Lerayer, L.S. Baldini, M. Leitão (2000) "Characterization of bacteriocins produced by lactococcus lactis strains" Brazilian Journal of Microbiology 31 184-192.
- 5) CS Ryu, JW Czajka, M Sakamoto, Y Benno (2001) "Characterization of the Lactobacillus casei group and the Lactobacillus acidophilus group by automated ribotyping" Microbiol Immunol 45(4) 271-275.
- 6) I.I. Burianek and A.E.Youssef " Solvent extraction of bacteriocins from liquid cultures" Letters in Applied Microbiology 31 193-197 (2000)

CONFRONTO TRA DIFFERENTI METODICHE COLTURALI PER LA DIAGNOSI DI MASTITE DA MYCOPLASMA

Garbarino C. A., Cammi G., Ricchi M., Arrigoni N.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna "Bruno Ubertini" - Sezione di Piacenza

Key words: Mycoplasma, mastitis, diagnosis

SUMMARY

Among the different species of *Mycoplasma* involved in bovine mastitis, *M.bovis* is the most prevalent and contagious. This pathogen causes important economic losses to dairy herds all over the world. Presently, neither effective control measures nor efficacious antibiotics and vaccines are available for *Mycoplasma* infection. For these reasons, the detection and consequent segregation of infected animals is the first step for managing *Mycoplasma* mastitis outbreaks.

In this regard, we evaluated two different microbiological procedures: direct culture on *Mycoplasma* agar media and culture on the same media after pre-enrichment in selective broth. Our results suggested that both methods are useful for the identification of infected animals; particularly, direct culture was essential for early recognition and segregation of high shedder animals, while enrichment was helpful in detection of low shedder animals. Despite the long time (14 days of incubation) required for the latter procedure, our results showed that it yielded 75% more isolates of *Mycoplasma* sp. than direct culture on *Mycoplasma* agar media plates.

INTRODUZIONE

Nel bovino almeno 11 specie di *Mycoplasma* possono essere responsabili dell'insorgenza di mastite; tra queste *M.bovis* risulta essere la specie dotata di maggiore patogenicità e più frequentemente associata alla patologia mammaria (1,2).

Isolato per la prima volta nel 1961 in USA (3) da un grave caso di mastite parenchimatosa acuta, *M.bovis* è responsabile nel bovino anche di altre patologie, quali polmoniti, artriti, otiti e disordini riproduttivi.

Le micoplasmosi da *M.bovis*, nelle diverse manifestazioni cliniche, risultano ampiamente diffuse nell'allevamento del bovino a livello mondiale (4,6).

La mastite da *M.bovis* è causa di gravi perdite economiche negli allevamenti colpiti, sia per l'alta contagiosità, che può rendere necessaria la riforma di numerosi animali, sia per il frequente instaurarsi di forme croniche con significativa riduzione della produzione latte e tendenza alla riacutizzazione. A questo si deve aggiungere la possibile insorgenza e diffusione di forme cliniche diverse (polmoniti, artriti, ecc.), dovute alla tendenza di *Mycoplasma* a diffondere ad altri distretti dell'organismo.

A tutt'oggi non esistono né vaccini efficaci nel prevenire l'infezione, né una terapia in grado di ottenere la sterilizzazione della mammella infetta (4,5).

La diagnosi eziologica della mastite da *Mycoplasma* richiede il supporto del laboratorio per la messa in evidenza del microrganismo nel latte mastitico. Nella gestione del focolaio inoltre tutte le bovine dell'allevamento vengono sottoposte ad esame colturale, per individuare quelle che, pur non presentando alcun segno di infezione, possono eliminare *Mycoplasma* con il latte e quindi risultare pericolose fonti di infezione per le bovine sane tramite la mungitura.

La metodica analitica routinariamente utilizzata sul latte individuale è la semina su terreno selettivo. Questo esame può

essere realizzato mediante due diversi procedimenti:

1. semina diretta su terreno selettivo solido;
2. pre-arricchimento del campione in terreno selettivo liquido e successiva semina su terreno solido.

Quest'ultima metodica, raccomandata per aumentare la sensibilità della coltura (1), presenta, rispetto alla prima, il vantaggio di una maggiore sensibilità nell'individuare animali debolmente eliminatori, talvolta asintomatici, ma richiede d'altro canto tempi di risposta più lunghi.

I dati riportati dalla letteratura relativamente alla maggiore sensibilità della metodica "previo arricchimento" sono però discordanti, e variano dal 6% al 70% (2).

Nel presente lavoro vengono riportati i risultati derivanti dalla ricerca di *Mycoplasma* in campioni di latte individuale bovino mediante analisi microbiologica eseguita in parallelo con entrambe le metodiche.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Nel periodo 2009-2011, presso la Sezione di Piacenza dell'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna, sono stati sottoposti a ricerca di *Mycoplasma* sp. 5978 campioni di latte individuale (pool dei 4 quarti), provenienti da 12 allevamenti di bovine da latte, sede di focolai di mastite da *Mycoplasma*.

E' stata raccomandata l'esecuzione del prelievo in condizioni di asepsi rigorosa. E' noto infatti che la presenza, anche a livelli minimi, di flora contaminante, può provocare l'inquinamento dei terreni, con conseguente impossibilità di lettura.

Tutti i campioni sono stati analizzati in parallelo, sia con la metodica diretta, sia previo arricchimento, come descritto di seguito:

Semina diretta su terreno solido:

Tre ml di latte di ogni campione sono stati sottoposti a centrifugazione a 1800g per 20 minuti. Il sedimento, previa eliminazione del surnatante, è stato piastrato mediante ansa ad anello, nella quantità di 10 µl, su PPLO agar (Oxoid), contenente 20% di siero equino, 5% di autolisato di lievito, tallio acetato (0,25 mg/ml) e penicillina (200 UI /ml).

Le piastre sono state incubate in termostato a 37 °C in condizioni di microaerofilia (10% di CO₂) per 7 giorni.

La lettura delle piastre veniva effettuata giornalmente, a partire da 48-72 ore di incubazione, allo stereomicroscopio per la ricerca delle tipiche colonie a "uovo fritto".

Semina previo arricchimento in terreno liquido:

Cinquecento µl di ogni campione di latte sono stati seminati in 4.5 ml di PPLO brodo (Oxoid), contenente il 20% di siero equino, 5% di autolisato di lievito, tallio acetato (0,25 mg/ml) e penicillina (200 UI /ml).

Dopo un'incubazione di 7 giorni in termostato a 37 °C in condizioni di microaerofilia (10% di CO₂), 10 µl di brodo sono stati seminati su piastre di PPLO agar, che sono quindi state incubate

in condizioni di microaerofilia (10% di CO₂) per 7 giorni.

La lettura delle piastre veniva effettuata giornalmente, a partire da 48-72 ore di incubazione, allo stereomicroscopio per la ricerca delle tipiche colonie a "uovo fritto".

Tipizzazione molecolare

Almeno un ceppo di *Mycoplasma* per ogni conferimento e tutte le colonie con aspetto atipico sono state sottoposte ad analisi biomolecolare.

A tale scopo sono state utilizzate:

1. una PCR per l'identificazione di *M.bovis*, descritta da Pinnow et al. (5);
2. una PCR, per l'identificazione di *Mycoplasma spp.*, descritta da van Kuppeveld et al. (8).

In caso di positività per *Mycoplasma spp.* e contemporanea negatività per *M.bovis*, la specie isolata è stata identificata mediante sequenziamento del rDNA 16S (Microseq, Applied Biosystems).

RISULTATI

Sono risultati positivi per *Mycoplasma sp.* l'8% dei campioni esaminati (467/5978). Di questi, il 42% (196/467) è stato individuato mediante entrambe le metodiche, il 9,6% (45/467) solo mediante semina diretta del sedimento ed il 48,4% (226/467) solo mediante semina previo arricchimento (vedi Tabella n° 1).

Valutando i risultati complessivi delle due diverse metodiche, si rileva che in totale i campioni risultati positivi alla semina diretta sono risultati 241, mentre alla semina previo arricchimento 422; ne consegue che l'analisi previo arricchimento riesce a rilevare il 75% in più di campioni positivi rispetto alla semina diretta.

Il dato relativo ai campioni risultati positivi alla sola semina diretta (45/467) deve essere interpretato tenendo conto che, in più del 50 % dei casi (23/45), il risultato della semina degli stessi campioni previo arricchimento non è risultato leggibile a causa dello sviluppo di una flora inquinante.

In accordo con quanto rilevato in letteratura, i ceppi di *Mycoplasma* isolati sono stati identificati, in 10 allevamenti su 12, come *M.bovis*, confermando la maggior importanza di questa specie come causa di mastite bovina rispetto alle altre specie di *Mycoplasma*.

Nei rimanenti due allevamenti sono stati rilevati rispettivamente *M.bovis genitalium* e *M.yeastii/cottewii*; in entrambi i focolai, le specie di *Mycoplasma* sono state isolate ripetutamente da più soggetti, alcuni dei quali colpiti da mastite clinica.

Tabella 1: Confronto tra i risultati dell'analisi microbiologica per ricerca *Mycoplasma* eseguita con metodiche diverse (semina diretta e previo arricchimento)

Totale campioni analizzati	Positivi per presenza <i>Mycoplasma</i>		
5978	467 (8%)	Positivi ad entrambe le metodiche	196 (42.0%)
		Positivi solo alla semina diretta del sedimento	45 (9.6%)
		Positivi solo alla semina previo arricchimento	226 (48.4%)

DISCUSSIONE

In relazione all'elevata contagiosità della mastite da *Mycoplasma*, risulta fondamentale adottare un protocollo diagnostico che consenta di individuare, con la maggior sensibilità possibile, i soggetti eliminatori sia clinici che subclinici, in modo da procedere alla loro mungitura separata e possibilmente ad un loro rapido allontanamento dalla mandria.

L'analisi microbiologica previo arricchimento in brodo selettivo ha permesso di aumentare la percentuale di isolamenti del 75% rispetto alla semina diretta, in accordo con alcuni autori che riportano un aumento del 70% di sensibilità (7).

Tale tipo di approccio si è dimostrato in grado di aumentare notevolmente la sensibilità nel rilevare i soggetti escretori, anche quando questi eliminano un numero ridotto di micoplasmi.

Questo riveste una particolare utilità nelle fasi avanzate della eradicazione dell'infezione, quando la maggior parte dei soggetti presenta infezioni subcliniche a bassa escrezione. D'altro canto, nella nostra esperienza, la metodica previo arricchimento presenta alcune criticità:

- prelievo del campione: le condizioni di asepsi durante il prelievo devono essere rigorose; particolare attenzione deve essere posta ad evitare "trascinamenti" da un campione all'altro attraverso l'utilizzo di materiale contaminato da latte infetto (guanti, mani ecc...);

- tempi di risposta: l'arricchimento del campione in brodo aumenta i tempi di risposta (almeno 14 giorni di incubazione);

- costi dell'analisi: superiori a quelli della semina diretta.

La semina diretta, pur dimostrando una sensibilità inferiore, presenta il vantaggio di una rapida individuazione degli animali ad alta escrezione, consentendone un pronto allontanamento dal resto della mandria. Tale metodica ha dimostrato inoltre una minore frequenza di contaminazione rispetto alla tecnica previo arricchimento.

Considerando che nel protocollo di intervento in un focolaio viene fortemente raccomandata l'individuazione e l'eliminazione di tutti gli animali con infezione intramammaria da *Mycoplasma* (4), alla luce dei presenti risultati, si ritiene ottimale l'utilizzo in parallelo di entrambe le metodiche colturali descritte, allo scopo di fornire un supporto diagnostico efficace.

BIBLIOGRAFIA

1. Fox L.K., Kirk J.H., Britten A.. (2005) *Mycoplasma Mastitis: A Review of Transmission and Control*. J.Vet.Med 52, 153-160.
2. Gonzales R.N., Wilson D.J (2003) *Mycoplasma mastitis in dairy herds*. Vet.Clin.Food. Anim. 19, 199-221.
3. Hale H.H, Helmboldt C.F, Plastringe, W.N., Stula E.F. (1962) *Bovine mastitis caused by Mycoplasma species*. Corn Vet 52, 582-591.
4. Maunsell A.R., Woolums, Francoz D., Rosenbusch R.F, Step D.L., Wilson D.J., Janzen E.D. (2011) *Mycoplasma bovis* Infections in Cattle. J.Vet.Intern. Med. 25:772-783.
5. Pinnow CC, Butler JA, Sachse K, Hotzel H, Timms LL, Rosenbusch RF. (2001). *Detection of Mycoplasma bovis in preservative-treated field milk samples*. J Dairy Sci., 84:1640-1645.
6. Nicholas R.A.J. (2011) *Bovine mycoplasmosis: silent and deadly*. Vet Rec 168: 459-462.
7. Thurmond M.C., Tyler J.W., Luiz D.M., Holmberg C.A., Picanso J.P. (1989) *The effect of pre-enrichment on recovery of Streptococcus agalactiae, Staphylococcus aureus and Mycoplasma from bovine milk*. Epidemiol. Infect. 103:465-472.
8. van Kuppeveld F.J, van der Logt JT, Angulo AF, van Zoest MJ, Quint WG, Niesters HG, Galama JM, Melchers W.J. (1992). *Genus- and species-specific identification of Mycoplasmas by 16S rRNA amplification*. Appl Environ Microbiol. 58:2606-2615.

EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DEL *BACILLUS ANTHRACIS* IN ITALIA

Garofolo G.¹, Fasanella A.¹

Ente: Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata – Centro di referenza Nazionale per l'Antrace¹

Keywords: *Bacillus anthracis*, MLVA, SNPs

ABSTRACT

To investigate the potential molecular diversity of *Bacillus anthracis* in Italy, canonical Single nucleotide polymorphism (canSNP) and Multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) genotyping was performed against all isolates from animal outbreaks registered in the last fifty years. 196 *B. anthracis* strains were analyzed. The canSNP analysis indicates the presence of four sublineages/subgroups each of which belong to one of the 12 worldwide CanSNP genotypes: B.Br.CNEVA (3 isolates), A.Br.005/006 (1 isolate), A.Br. 001/002 (1 isolate) and A.008/009 (191 isolates). The latter is the dominant canSNP genotype in Italy. The analyses revealed a complex genetic structure that is likely to have involved the introduction and re-introduction of this disease through repeated human activity led by the trading of commodities.

INTRODUZIONE

Il carbonchio ematico è una patologia cosmopolita con il solo l'Antartide ritenuto territorio completamente indenne nel Mondo. Solo all'inizio del XX secolo era tra le principali cause di morte del bestiame, ma negli ultimi 50 anni, le migliorate condizioni di allevamento insieme al sistematico uso del vaccino in campo veterinario hanno ridotto notevolmente la sua incidenza[1]. Oggi è ritenuto ancora endemico nelle nazioni sottosviluppate dell'Asia, Africa e Sud America, mentre è sporadico in nazioni economicamente progredite in Europa e in Nord America[2]. In Italia si registrano aree con incidenza ipoendemica sia nel centro-sud che nelle isole maggiori mentre nel nord si ritrovano sporadici foci attivi nel solo settore alpino orientale[3, 4].

Negli ultimi anni numerosi studi di caratterizzazione molecolare del *Bacillus anthracis* si sono succeduti portando alla delucidazione della sua evoluzione e dispersione nel mondo[5, 6].

Se da una parte lo studio genetico dell'antrace è stato perseguito al fine di ottenere un migliore standard di biosicurezza, genotipizzando la maggior parte dei ceppi di antrace, dall'altro si è ottenuto un potente strumento epidemiologico in grado di tracciare, monitorare ed indagare in maniera approfondita la presenza dei cloni attivi sul territorio. Seguendo uno schema di genotipizzazione definito PHARMA (Progressive hierarchical resolving assays using nucleic acids) [7] i ceppi di *B. anthracis* italiani sono stati analizzati delucidando le connessioni filogenetiche con i ceppi mondiali e migliorando la mappa epidemiologica italiana.

MATERIALI E METODI

B. anthracis

Sono stati analizzati 184 ceppi di *B. anthracis* e 12 DNA di *B. anthracis* della collezione del Centro di Referenza Nazionale per l'Antrace provenienti da 11 regioni di Italia isolati negli ultimi 50 anni. La maggior parte degli isolati proviene dalle regioni del sud d'Italia con 43 ceppi dalla Puglia, 64 dalla Basilicata, 18 dalla Sardegna, 16 dalla Sicilia e 4 dalla Campania, mentre meno consistente è il numero dei

ceppi per le regioni del centro e nord Italia con 29 isolati in Toscana, 2 in Lazio, 2 in Veneto, 1 in Umbria, 1 in Lombardia e 1 in Trentino Alto Adige.

CanSNPs

La ricerca dei polimorfismi per i CanSNPs è stata effettuata con saggi di PCR per discriminazione allelica utilizzando sonde MGB come precedentemente descritto.

MLVA 15 loci

Per la MLVA 15 loci abbiamo utilizzato 15 coppie di primers fluorescinati disegnati per la ricerca dei VNTRs (vrrb1, vrra, vrrb2, pXO1, pXO2, vrrc1, vrrc2, cg3, vntr16, vntr19, vntr32, vntr12, vntr17, vntr23, vntr35). 4 PCR multiplex e 2 singleplex sono state utilizzate per l'amplificazione dei 15 loci. I prodotti di PCR sono stati sottoposti ad elettroforesi capillare su genetic Analyzer ABI-Prism 3130 e successivamente analizzati con software Genemapper 4.0 (Applied Biosystem).

Analisi Filogenetica

Il profilo dei CanSNPs è stato confrontato con i dati di Van Ert et al. (2007) ed assegnato al suo sottocluster filogenetico di appartenenza. L'analisi dei cluster con metodo UPMGA per la MLVA 15 è stata effettuata con i software START e MEGA3.

RISULTATI

Canonical SNPs

L'analisi dei CanSNP ha ritrovato in Italia 4 sottogruppi a fronte dei 12 presenti nella popolazione mondiale di *B. anthracis*. Su 196 ceppi di *B. anthracis* isolati in Italia 194 isolati appartengono al lignaggio maggiore A, con 192 identificati nel sottogruppo A Br. 008/009 meglio definito come sottogruppo Trans Euro Asiatico, 1 appartenente al sottogruppo A br. 001/002 e 1 appartenente al raro A. br. 005/006. I rimanenti 2 ceppi sono stati assegnati al più raro lignaggio B nel sotto lignaggio B Br. CNEVA.

MLVA 15 loci

L'analisi dei cluster con il metodo del UPMGA individua 2 cluster distinti in chiaro accordo ai 2 lignaggi maggiori dei CanSNPs, suddivisi in 32 genotipi diversi. Il sottogruppo trans euroasiatico con i suoi 192 isolati presenta ben 29 genotipi diversi.

Discussione

La struttura genetica della popolazione del *B. anthracis* solo recentemente è stata delucidata su scala mondiale attraverso dati genetici integrati da modelli di diffusione geografica. Van Ert et al.[6] attraverso la comparazione genetica di 7 sequenze complete di ceppi di *B. anthracis* e la conseguente selezione di 13 CanSNPs ha portato alla definizione per l'antrace circolante nel mondo di 12 sottolignaggi e sottogruppi divisi in 3 lignaggi maggiori A, B e C. Il sistema di genotipizzazione dell'antrace universalmente riconosciuto come più efficace, prevede l'utilizzo di un metodo genomico di tipo gerarchico che analizza ogni isolato dapprima con marker geneticamente più stabili come i CanSNPs e poi più mutageni come i VNTRs e gli SNRs.

Seguendo questo approccio, i dati dei CanSNPs e MLVA 15 qui presentati chiariscono la storia dell'antrace in Italia relazionandolo con i modelli di diffusione mondiale. Fasanella

et. al. 2005 [4] in uno studio precedente, in maniera pionieristica stabilirono usando la MLVA a 8 loci che 64 ceppi italiani appartenevano al solo Cluster A1.a normalizzando e riferendo i dati alla mappa genetica di Keim et al. [5]. I genotipi ritrovati furono 10 ma la maggioranza dei ceppi apparteneva a solo 2 genotipi, facendo supporre che in Italia l'antrace avesse un unico progenitore ancestrale.

Il presente studio chiarisce queste prime conclusioni grazie al potere filogenetico dei canSNPs, la maggiore risoluzione del pannello a 15 loci, e ad un campionamento più significativo dal punto di vista territoriale, essendosi aggiunti 125 ceppi rappresentativi di nuove località.

L'analisi dei CanSNPs suggerisce come in Italia come in tutto il continente Euroasiatico il sottogruppo Trans Euro Asiatico (A. br. 008/009) è il sottogruppo genetico dominante confermando il dato di Fasanella *et al.*. Infatti i 29 genotipi di MLVA 15 del sotto gruppo Trans Euro Asiatico sono la prova schiacciante, a prescindere dai limiti del campionamento, dei continui focolai ad opera di questo sotto gruppo genetico in Italia. Inoltre la presenza di altri gruppi genetici come il A br. 001/002 e A br. 005/006 ma soprattutto il lignaggio B con il sottolignaggio B. br. CNEVA suggeriscono come in Italia ad un'introduzione primaria si siano comunque succedute introduzioni e reintroduzioni di differenti cloni di antrace, facendo ritenere superata l'idea di un unico progenitore ancestrale nella nostra penisola. La prova storica di questo dato è da ricercare nel commercio delle popolazioni del mediterraneo dell'impero romano e delle repubbliche marinare, grazie ai continui movimenti di merci, animali vivi e prodotti di origine animale come le pelli. La segnalazione di un ceppo isolato nel 1989 nella provincia di Verona del gruppo A br. 005/006 è rara in Europa ma frequente in Africa tanto da far credere questo dato una vera e propria stranezza. La rarità di questo evento potrebbe essere spiegata solo attraverso un'introduzione di questo genotipo esotico attraverso le attività commerciali delle repubbliche marinare con l'Africa. Inoltre l'isolamento in campo con 2 focolai accertati, uno in Veneto e uno in Trentino Alto Adige del lignaggio B, suggeriscono e confermano come in territori limitrofi al settore alpino questo gruppo genetico possa avere trovato una nicchia ecologica a lui favorevole.

I 29 genotipi di MLVA 15 migliorano la mappa epidemiologica italiana dell'antrace evidenziando una variabilità dei genotipi nei territori dove la malattia è enzootica come il parco nazionale del Gargano, il parco nazionale del Pollino e alcune aree limitrofe a parchi nazionali in Sicilia. Il potere di risoluzione della MLVA 15 risulta quindi triplicato rispetto MLVA 8 che riusciva ad identificare solo 10 genotipi diversi. Le correlazioni epidemiologiche ritrovate in Italia sebbene siano estremamente interessanti potrebbero essere approfondite attraverso nuovi studi molecolari usando la tecnologia dei Next Generation Sequencing (NGS) Instruments per generare uno studio di SNPs degli isolati sul territorio italiano.

La potenzialità e la validità di questo approccio, su un batterio di tipo clonale, con un trasferimento laterale di geni praticamente nullo come il *B. anthracis* sono indubbie, anche perché consentirebbero di generare una mappa filogenetica propria dei ceppi italiani. L'uso di dati di sequenza da NGS sulla collezione in nostro possesso sarebbe innovativo in Italia e porterebbe a migliorare le conoscenze epidemiologiche dell'antrace in Italia e al tempo stesso potrebbero divenire un paradigma metodologico da applicare anche ad altri patogeni zoonosici.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano per l'eccellente assistenza tecnica Angela Aceti, Rosa d'Errico, Nicola Nigro e Giuseppe Stramaglia.

BIBLIOGRAFIA

1. Fasanella A, Galante D, Garofolo G, Jones MH: Anthrax undervalued zoonosis. *Vet Microbiol* 2010, 140:318-331.
2. Hugh-Jones M: 1996-97 Global Anthrax Report. *J Appl Microbiol* 1999, 87:189-191.
3. Garofolo G, Serrecchia L, Corro M, Fasanella A: Anthrax phylogenetic structure in Northern Italy. *BMC Res Notes*, 4:273.
4. Fasanella A, Van Ert M, Altamura SA, Garofolo G, Buonavoglia C, Leori G, Huynh L, Zanecki S, Keim P: Molecular diversity of *Bacillus anthracis* in Italy. *J Clin Microbiol* 2005, 43:3398-3401.
5. Keim P, Price LB, Klevytska AM, Smith KL, Schupp JM, Okinaka R, Jackson PJ, Hugh-Jones ME: Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 2000, 182:2928-2936.
6. Van Ert MN, Easterday WR, Huynh LY, Okinaka RT, Hugh-Jones ME, Ravel J, Zanecki SR, Pearson T, Simonson TS, U'Ren JM, et al: Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*. *PLoS One* 2007, 2:e461.
7. Keim P, Van Ert MN, Pearson T, Vogler AJ, Huynh LY, Wagner DM: Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. *Infect Genet Evol* 2004, 4:205-213.

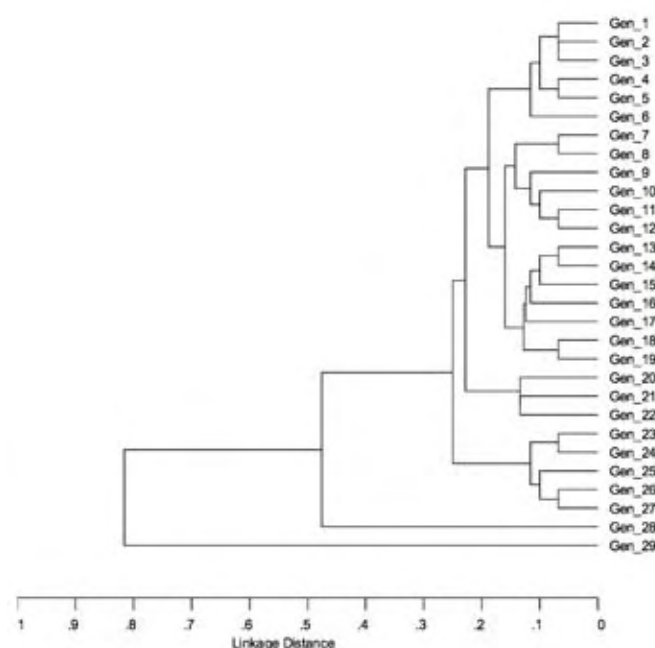


Fig.1 – Albero filogenetico MLVA 15 con metodo UPMGA dei ceppi di *B. anthracis* isolati in Italia.

DIAGNOSI DI PARVOVIRUS CANINO E CARATTERIZZAZIONE DELLE VARIANTI ANTIGENICHE PRESENTI IN PIEMONTE

Giorgi I., Dondo A., Rossi F., Zoppi S., Sant S., Monnier M., Grattarola C.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta

Keywords: Canine Parvovirus, Immunocromatographic Test, PCR

SUMMARY

Canine parvovirus (CPV) is a new virus, which is continuing to evolve, giving rise to new antigenic types and virus mutants, that spread through the dogs population. In this report we tested sensitivity and specificity of immunocromatografich test for CPV and the distribution of its variants by means of molecular methods. We analyzed 156 faecal samples from dogs suspected to be infected by CPV. The test ICT showed good specificity (80% - IC95%: 68.9-91.1) but low sensitivity (55,7% - IC95%: 46.2-65.1). The more representative class of CPV in Piedmont is 2/2a (78,3%). It is recommended to use both ICT and molecular methods to obtain reliable diagnosis of CPV.

INTRODUZIONE

Il parvovirus canino (CPV) è un virus a DNA monocatenario, appartenente alla famiglia delle Parvoviridae. Tale famiglia comprende virus molto piccoli (da qui il nome parvus), con virioni di dimensioni di 18-26 nm. Sono virus nudi a simmetria icosaedrica; il guscio è formato da 60 subunità proteiche, composte da un peptide maggiore (VP2) e da uno minore (VP1). Un terzo peptide, VP3, si genera per clivaggio enzimatico della VP2 nei capsidi maturi. Essendo privi di envelope sono virus molto resistenti, capaci di sopportare una temperatura di 60° per 1 ora e pH fra 3 e 9; resistono ad enzimi proteolitici e ai più comuni disinfettanti.

L'infezione da parvovirus nel cane determina una grave gastro-enterite spesso ad esito letale. Lo stesso virus, nei cuccioli, può determinare una morte improvvisa per insufficienza cardiaca.

La replicazione del virus avviene a livello dei linfonodi e dell'orofaringe. Segue una fase di generalizzazione per via linfematogena con localizzazione secondaria a livello degli organi linfoidi e della mucosa intestinale. Ciò determina la massiva eliminazione del virus a livello delle feci e coincide con l'insorgenza delle manifestazioni tipiche della malattia: vomito, depressione, anoressia e febbre, seguiti da diarrea con feci di consistenza pastosa o liquida, spesso con sangue. La forma miocardica rappresenta la conseguenza della localizzazione del CPV al muscolo cardiaco nel periodo perinatale.

Il principale fattore che influenza la mortalità è dato dall'età dei soggetti colpiti, diminuendo all'aumentare di essa.

Il ceppo originale di canine parvovirus, è stato scoperto nel 1967 e denominato CPV-1; questo ceppo apatogeno non ha mai rappresentato un reale problema sanitario. Alla fine degli anni 70 è comparso improvvisamente il CPV-2. La sua comparsa improvvisa in diverse parti del mondo e l'assenza di anticorpi specifici in sieri di cane prima del 1978, ha fatto ritenere che potesse essere una variante del parvovirus del gatto, agente della panleucopenia felina, adattato alle

cellule di cane e diffuso accidentalmente attraverso vaccini oppure una virulentazione di ceppi apatogeni presenti nel cane (1). Successive mutazioni genetiche hanno portato alla diffusione di due varianti antigeniche, denominate tipo 2a e tipo 2b, che sono adesso diffuse in tutto il mondo (2). Una successiva mutazione ha portato alla formazione di una terza variante, denominata CPV-2c, che è stata riscontrata in Italia nel 2000 (3) e tuttora circola insieme alle varianti 2a e 2b (4).

Le varianti antigeniche differiscono dal ceppo originale 2a per la differenza di alcuni aminoacidi della proteina VP2, dovuti al polimorfismo di un singolo nucleotide a livello del genoma (4,5). Nonostante il suo corredo genetico sia a DNA, CPV possiede un'elevata percentuale di sostituzione genetica, simile a quella osservata per i virus ad RNA, responsabile di modificazioni genetiche continue e rapido spiazzamento dei vecchi stipiti virali da parte delle nuove varianti antigeniche (6).

Pertanto, sulla base del confronto tra i risultati ottenuti con un test immunocromatografico (ICT) del commercio con quelli della PCR per la ricerca di parvovirus, si è cercato di stabilire l'efficienza diagnostica del test di screening rispetto alla variabilità antigenica dei ceppi di CPV circolanti. Contestualmente si è anche giunti, mediante l'analisi genetica dei ceppi virali isolati dai campioni, ad una valutazione della diffusione delle tre varianti antigeniche sul territorio di competenza.

MATERIALI E METODI

Campionamento – In questo studio sono stati presi in esame 156 campioni di feci, prelevati da cani deceduti con anamnesi e/o rilievi necroscopici riferibili ad un quadro di gastroenterite da CPV nel periodo compreso tra novembre 2009 e agosto 2011.

Indagini di laboratorio – Tutti i campioni sono stati sottoposti a test ICT per parvovirus ed ad analisi PCR per il rilevamento di DNA di CPV. L'analisi di sequenza sui campioni che hanno generato un amplicone specifico alla PCR ha permesso di identificarne il sottotipo.

Il metodo Immunocromatografico Il kit si basa sulla tecnica immunocromatografica dove si utilizza un anticorpo monoclonale specifico contro il parvovirus canino, marcato con oro colloidale.

Analisi PCR – I campioni in esame sono stati sottoposti a estrazione del DNA genomico utilizzando il kit AllPrep DNA/RNA Mini kit (Qiagen) e ad amplificazione del gene codificante per la proteina capsidica VP2 mediante simplex PCR utilizzando i primers 555-For e 555-Rev descritti da Buonavoglia C. et al. (3). I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2%.

Tabella n. 1: i campioni positivi alla PCR sono stati suddivisi in due tabelle: nella parte in grigio sono riportati i positivi e negativi al test ICT in funzione dello stipite virale riscontrato; nella parte in bianco, i risultati concordi e non concordi ottenuti con l'applicazione dei due test.

		ICT						TOT
		POS			NEG			
PCR	POS	2/2a	2b	2c	2/2a	2b	2c	106
		47	3	9	36	5	6	
		59			47			
	NEG	10			40			50
TOT		69			87			156

Analisi di Sequenza - I campioni che in seguito a PCR presentavano l'amplicone specifico di 583 bp sono stati sottoposti ad analisi della sequenza nucleotidica effettuata con metodo Sanger automatizzato per l'identificazione dei ceppi virali CPV2-2a, CPV2b (vaccinale e di campo), CPV2c.(7)

RISULTATI

Nella tabella n. 1 sono indicati i risultati dell'applicazione del test ICT e della metodica in PCR.

I campioni positivi alla PCR e sottoposti al sequenziamento hanno dato i risultati esposti in tabella n. 2.

DISCUSSIONE

Dal confronto dei risultati delle metodiche applicate, si può concludere che gli esiti del test ICT non sono influenzati dallo stipite virale in esame. Infatti, le performance del test ICT, nell'ambito dei campioni oggetto di studio, non variano al variare dello stipite evidenziato. Si può ipotizzare che la variabilità antigenica delle tre varianti non sia tale da influenzare il legame con l'anticorpo utilizzato dal test ICT.

Tabella n. 2: totale dei campioni positivi alla PCR in funzione dei risultati del sequenziamento

TOTALE POSITIVI	2/2a	2b	2c
106	83	8	15

Da segnalare il rilevamento di 47 falsi negativi (54%) al test ICT, sulla base dell'esito delle indagini biomolecolari e pertanto, l'applicazione del test immunocromatografico ha mostrato una sensibilità del 55,7% (IC95%: 46.2-65.1) ed una specificità del 80% (IC95%: 68.9-91.1) sui campioni in esame.

Questo dato potrebbe essere spiegato, oltre che dalla minor

sensibilità del test immunocromatografico rispetto alla PCR, anche dal fatto che alcuni degli animali campionati non si trovavano nella fase acuta della malattia, quando l'escrezione virale è massima (8).

Sulla base dei risultati ottenuti dal sequenziamento si può concludere che i ceppi maggiormente rappresentati (78,3%) sul territorio piemontese rientrano nel gruppo 2/2a.

La metodica applicata, non consentendo la distinzione del ceppo 2 da quello 2a, non permette il confronto con i dati bibliografici a disposizione. Tuttavia, basandoci sui dati presenti in letteratura (9,10), il ceppo 2 è quasi totalmente scomparso dal territorio, surclassato dalle varianti 2a,2b e 2c.

È infine sovrapponibile a quanto descritto in letteratura, la prevalenza dei ceppi 2c rispetto ai 2b (9).

In base ai risultati ottenuti nel presente lavoro, si ritiene che il test immunocromatografico possa essere utilizzato come test di screening ma, soprattutto in animali morti per sospetta gastroenterite virale da CPV, dovrebbe essere sempre affiancato dalla PCR come test di conferma.

BIBLIOGRAFIA

1. Truyen U. Emergence and recent evolution of canine parvovirus. *Vet. Microbiol.* 69, 47-50
2. Truyen U. Evolution of canine parvovirus—a need for new vaccines? *Vet Microbiol.* 2006;117:9–13
3. Buonavoglia C, Martella V, Pratelli A, Tempesta M, Cavalli A, Buonavoglia D, et al. Evidence for evolution of canine parvovirus type-2 in Italy. *J Gen Virol.* 2001;82:3021–5
4. Decaro N, Elia G, Martella V, Campolo M, Desario C, Camero M, et al. Characterisation of the canine parvovirus type 2 variants using minor groove binder probe technology. *J Virol Methods.* 2006;133:92–9
5. Martella V, Cavalli A, Pratelli A, Bozzo G, Camero M, Buonavoglia D, et al. A canine parvovirus mutant is spreading in Italy. *J Clin Microbiol.* 2004;42:1333–6.
6. Shackelton LA, Parrish CR, Truyen U, Holmes EC. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:379–84.
7. Decaro N., Elia G., Martella V., Desario C., Roperto S., Martella Campolo M.V., Lorusso A., Cavalli A., Buonavoglia D., A minor groove binder probe real-time PCR assay for discrimination between type 2-based vaccines and field strains of canine parvovirus. *Journal of Virological Methods* 136(2006) 65-70
8. Mason G. Use diagnostics to help confirm parvo. *DVM* 1 march 1999
9. Decaro N., Desario C., Addie D.D., Martella V., Joao Vieira M., Elia G., Zipola A., Davis C., Thompson G., Thiry E., Truyen U., Buonavoglia C. Molecular epidemiology of canine parvovirus. *Europe Emerging infectious disease* – www.cdc.gov/eid - Vol. 13, No. 8, August 2007
10. Parrish CR, Aquadro CF, Strassheim ML, et al.: 1991, Rapid antigen-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *J Virol* 65:6544–6552.

DIFFUSIONE DI *GIARDIA DUODENALIS* IN ALLEVAMENTI BOVINI STANZIALI IN AREA METROPOLITANA (PALERMO)

***Glorioso N. S., Reale S., Migliazzo A., Lupo T., Chifari P., Alberti P., Galante A., Lo Verde V., Piazza M., **Rapisarda G., Vitale F.**

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia – Area Biologia Molecolare
*ASP Palermo (Italy), ** Università degli Studi di Messina Facoltà di Medicina Veterinaria

Key words: Giardia, PCR, DNA

ABSTRACT

Giardia infection is common in livestock and it has been reported frequently in young calves. Given the intensive nature of the cattle industry, anthroponotic transmission is likely to occur frequently. The aim of present study was to evaluate the zoonotic potential of *G. duodenalis* in dairy calves, younger six months old, coming from farms of Palermo city. Faecal samples from dairy calves (both males and females), belonging to various farms, were collected directly from rectum of each calf, examined by molecular approach based on DNA extraction and PCR-sequencing. The Giardia prevalence was calculated based on the total examined samples. The genotype E is consistent with the high prevalence in livestock animals in Italy and worldwide, whereas the presence of subtype A1 in calves indicates that these animals can be a source of *G. duodenalis* cysts that have the potential to infect also humans.

INTRODUZIONE

Nel campo delle zoonosi animali rientrano i protozoi appartenenti al Genere *Giardia spp.*, frequenti agenti di malattie enteriche sia nell'uomo che negli animali, che possiedono una grande variabilità genotipica e fenotipica al quale è correlato un differente potenziale zoonotico. L'onnipotente *Giardia* è un protozoo flagellato ubiquitario presente soprattutto nelle acque; è cosmopolita ed ha come ospiti sia l'uomo che 40 diverse specie di animali. I parassiti vengono espulsi nell'ambiente con le feci in forma cistica, ciò permette loro di sopravvivere in ambiente esterno per parecchio tempo. Una volta ingerite le oocisti liberano nell'intestino i trofozoiti, questi si replicano aderendo alla mucosa intestinale, causando così la sintomatologia intestinale tipica (soprattutto diarrea e disidratazione), e successivamente liberando nell'ambiente altri trofozoiti in forma cistica.

La trasmissione della malattia è principalmente oro-fecale tramite ingestione degli alimenti o delle acque contaminate o, più raramente, tramite contatto diretto da un ospite all'altro; le oocisti sono presenti nel 65-79% delle acque di superficie come laghi o fiumi e si ritrovano in acque ricreative (piscine e fontane), suolo e vegetali. Esiste anche nell'uomo il rischio di trasmissione con cibi manipolati da operatori infetti. La prevalenza varia dal 2-5% nei paesi industrializzati al 20-30% in quelli in via di sviluppo.

La tassonomia del parassita è complessa e *G. duodenalis* è la sola specie infettiva per l'uomo; la caratterizzazione molecolare degli isolati ha rivelato 7 grandi genotipi (assemblaggi) per *G. duodenalis* che sembrano avere ospiti diversi. Gli assemblaggi A e B infettano l'uomo, i ruminanti domestici, i suini, i carnivori domestici ed altri mammiferi; gli assemblaggi C e D infettano i cani; l'assemblaggio E il bestiame ungulato; l'assemblaggio F i gatti e quello G i ratti.

Nel settore zootecnico la prevalenza di *Giardia* nei vitelli sotto i 6 mesi di età varia tra il 20% ed il 73%, ciò, insieme alla

natura intensiva degli allevamenti zootecnici e all'alta densità di popolazione in Europa possono probabilmente essere fattori favorevoli alla trasmissione antroponotica della malattia. Il presente lavoro ha lo scopo di determinare la prevalenza della *Giardia* nella popolazione bovina ed in particolare nei vitelli con età inferiore o uguale a 6 mesi di alcuni allevamenti bradi insistenti nel Comune di Palermo al fine di stabilire se gli animali di allevamento siano infettati da ceppi zoonotici e quindi se le loro feci costituiscano una fonte di contaminazione ambientale capace di rappresentare un rischio per la salute pubblica.

MATERIALI E METODI

Per lo svolgimento dell'indagine sono stati selezionati 14 allevamenti distribuiti nel territorio palermitano ed analizzati n° 143 campioni di feci di vitelli di età inferiore o uguale a 6 mesi. I campioni di feci sono stati prelevati direttamente dal retto degli animali con guanti monouso; le feci, introdotte in opportuni contenitori di plastica sterili, sono state sigillate e etichettate e mantenute a 4°C fino all'arrivo dei campioni in laboratorio. Gli stessi sono stati analizzati entro 6 ore dal prelievo.

I campioni fecali sono stati sottoposti a purificazione mediante gradiente di saccarosio, secondo la metodica descritta da Olson (1997). Successivamente, i campioni sono stati analizzati mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) Gene Trios fosfato isomerasi (TPI).

Estrazione del DNA e amplificazione mediante PCR.

Il DNA è stato estratto secondo il metodo Da Silva (1999), purificato utilizzando il kit FastDNA (Q-Biogene) e l'eluato finale è stato purificato ulteriormente usando il kit Qiaquick (Quiagen). L'amplificazione del gene TPI è stata eseguita usando un protocollo di PCR Nested precedentemente descritto (Sulaiman et al., 2003). Nella prima reazione si otteneva un frammento di 605 pb mentre nella seconda un frammento di 532 pb rilevato attraverso migrazione elettroforetica in gel di agarosio all'1%.

Sequenziamento del DNA.

I campioni positivi alla PCR, infine, sono stati sottoposti a sequenziamento utilizzando un sequenziatore automatico ABI PRISM 310. Le sequenze ottenute in questi studi sono state allineate con sequenze di riferimento utilizzando il software Clustalv X.

RISULTATI E DISCUSSIONI

I risultati dell'indagine preliminare sono mostrati in Tabella 1. In seguito all'estrazione del DNA ed all'amplificazione mediante PCR solo 29 su 143 (20.27%) campioni di feci hanno dato esito positivo alla PCR e si è riscontrato che il genotipo A (sottotipo A1) è presente in 6 campioni di 2 differenti allevamenti (PA7-PA10).

Negli ultimi anni l'interesse della comunità scientifica nei confronti delle infezioni da *Giardia* è aumentato notevolmente a causa delle sempre più numerose segnalazioni di focolai

di infezione e di epidemie a veicolo idrico anche nei paesi industrializzati. Pur se l'indagine è stata condotta su un numero limitato di allevamenti, i risultati ottenuti hanno confermato quanto già menzionato in letteratura dimostrando la circolazione di tali protozoi nel bestiame e di conseguenza nell'ambiente, soprattutto nelle acque superficiali destinate all'utilizzo umano o all'irrigazione dei terreni coltivati rappresentando così un rischio non solo per gli operatori del settore zootecnico ma anche per la salute pubblica.

Il riscontro di un genotipo patogeno per l'uomo impone ulteriori approfondimenti sia sugli animali che sui proprietari/detentori degli stessi anche mediante l'implementazione di un sistema di indagine mediante questionario riguardante soprattutto le modalità di governo degli animali e le abitudini igienico-sanitarie del personale che accudisce gli stessi non solo in allevamento ma anche all'interno della sfera privata e familiare al fine di ricavare ulteriori informazioni che possano epidemiologicamente contribuire a stimare il rischio zoonotico della Giardiasi.

BIBLIOGRAFIA

1. Anganaro G., Maggi P., Di Bari M.A., Larocca A.M., Congedo P., Di Bari C., Brandonisio O., Chiodo F., (1997) – Giardiasis in HIV: a possible role in patients with severe immune deficiency, Eur. Journal Epidemiol., 13, 485-487.
2. Appelbee A.J., Frederick L.M., Heitman T.L., Olson M.E. (2003) – Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada, Vet. Parasitology, 112, 289-294.

3. Capelli G., Paoletti B., Iorio R., Frangipane Di Regalbono A., Pietrobelli M., Bianciardi P., Giangaspero A. (2003) – Prevalence of *Giardia* spp. In dogs and human in northern and central Italy, Parasitology Research, 90, S154-155.
4. Da Silva A.J., Bornay-Llinares F.J., Moura I.S.N., Slemenda S.B., Tuttle J.L., Pieniazek N.J., (1999) – Fast and reliable extraction of protozoan parasite DNA from faecal specimens, Mol. Diagn., 4, 57-64.
5. Geurden T., Geldhof P., Levecke B., Martens C., Berkvens D., Casaert S., Vercruisse J., Claerebout E. (2008) – Mixed *Giardia duodenalis* assemblage A and E infection in calves, Int. Journal for Parasitology, 38, 259-264.
6. O'Handley R.M., Olson M.E., Fraser D., Adams P., Thompson R.C., (2000) – Prevalence and genotypic characterisation of *Giardia* in dairy calves from Western Australia and Western Canada, Veterinary Parasitology, 90, 193-200.
7. Ralston B.J., McAllister T.A., Olson M.E., (2003) – Prevalence and infection pattern of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in range beef calves and their dams, Veterinary Parasitology, 114, 113-122.
8. Santin M., Trout J.M., Fayer R., (2009) – A longitudinal study of *Giardia duodenalis* genotypes in dairy cows from birth to 2 years of age, 162, 40-45.
9. Trout J.M., Santin M., Greiner E., Fayer R. (2004) – Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in pre-weaned dairy calves, Veterinary Parasitology, 124, 179-186.
10. Trout J., Santin M., Fayer R. (2007) – Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in adult dairy cows, Veterinary Parasitology, 147, 205-209

Tabella 1. Risultati delle indagini in seguito all'estrazione del DNA e all'amplificazione mediante PCR dai campioni positivi per *Giardia*.

Allevamenti (N° campioni testati)	Ubicazione allevamento	N° PCR positive	Genotipo	Sottotipo
PA1 (10)	C.da Bellolampo	2	E	/
PA2 (2)	C.da Sferracavallo	/	/	/
PA3 (20)	C.da Inserra	/	/	/
PA4 (27)	Monte Pellegrino	5	E	/
PA5 (6)	C.da Bellolampo	2	E	/
PA6 (13)	C.da Sferracavallo	8	E	/
PA7 (8)	C.da Inserra	4	A	A1
PA8 (9)	Monte Pellegrino	/	/	/
PA9 (8)	Monte Pellegrino	1	E	/
PA10 (9)	C.da Bellolampo	2	A	A1
PA11 (7)	C.da Bellolampo	/	/	/
PA12 (10)	C.da Bonpensiero	4	E	/
PA13 (6)	C. da Mulino Carte	1	E	/
PA14 (8)	C.da Inserra	/	/	/
TOT.		29/143 (20.27%)		

DESCRIZIONE DI UN FOCOLAIO DI SALMONELLOSI E BOTULISMO IN VOLATILI ACQUATICI IN PIEMONTE

Grattarola C., Zoppi S., Fezia G., Vencia W., Corvonato R. L., Rossi F., Giorgi I., Dondo A.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta

Keywords: *Salmonella* Typhimurium – water birds – botulinum type C

SUMMARY

In this report we described pathological findings and diagnostic investigations occurred in a simultaneous outbreak of salmonellosis and botulism type C in waterbirds. Occurrence of a dual infection in wild birds should be systematically monitored by means of a structured diagnostic protocol in order to minimize the risk to spread infectious and zoonotic agents

INTRODUZIONE

Le infezioni provocate da salmonella si distinguono in forme tifoidee (*S. typhi* e *S. paratyphi*, responsabili della febbre tifoide e delle febbri enteriche in genere), in cui l'uomo rappresenta l'unico serbatoio del microrganismo, e forme non tifoidee, causate dalle cosiddette salmonelle minori (come *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*), responsabili di forme cliniche a prevalente manifestazione gastroenterica sia negli animali che nell'uomo.

Le salmonelle non tifoidee, infatti, responsabili di oltre il 50% del totale delle infezioni gastrointestinali, sono una delle cause più frequenti di malattie a trasmissione alimentare (MTA). I principali serbatoi dell'infezione sono rappresentati dagli animali, i loro derivati e l'ambiente (acque non potabili).

Anche il botulismo aviario è un'intossicazione che colpisce gli uccelli ed è fortemente condizionata da fattori ambientali (2). *Clostridium botulinum* è un comune batterio della putrefazione ed è diffuso in natura in tutti i terreni; per svilupparsi richiede temperature elevate e tessuti animali in decomposizione, in un ambiente privo di ossigeno, condizioni che si ritrovano, ad esempio, in prossimità di zone paludose o letti di torrenti in asciutta, in particolare nel periodo estivo.

La tossina botulinica è una proteina prodotta dal suo metabolismo e ne sono noti almeno sette diversi tipi di tossine; la tossina di tipo C è estremamente tossica per le anatre, le oche e i limicoli, mentre la tossina di tipo E colpisce principalmente gli uccelli ittiofagi.

Il presente lavoro descrive le indagini condotte in un focolaio di salmonellosi e botulismo aviario, verificatosi contemporaneamente in un gruppo di volatili acquatici stanziati tra il torrente Grue e il torrente Scrivia, in provincia di Alessandria, mirate ad individuare la dinamica d'infezione e descrivere l'approccio diagnostico.

MATERIALI E METODI

Campionamento – A partire dalla fine del mese di giugno 2011, sono stati segnalati episodi ripetuti di mortalità elevata, per un totale di circa 200 animali, in volatili acquatici tra cui germani reali e anatre selvatiche (*Anas platyrhynchos*, *Anas spp.*), garzette (*Egretta garzetta*), albastrelli (*Tringa stagnatilis*), piro piro piccoli (*Actitis hypoleucos*), cavalieri d'Italia (*Himantopus himantopus*) ed alcuni gabbiani comuni (*Chroicocephalus ridibundus* e *Larus ridibundus*) nei comuni di Castelnuovo Scrivia e Cassano Spinola (Alessandria) in acque stagnanti del torrente Grue e Scrivia, in prossimità di scarichi di depuratore.

Nella Tabella n. 1 sono riportati gli animali conferiti all'Istituto Zooprofilattico di Torino per approfondimenti diagnostici. Complessivamente sono stati esaminati 9 animali morti, conferiti in un periodo compreso tra il 12 luglio e il 9 agosto 2011.

Indagini di laboratorio – Su tutti gli animali sono stati eseguiti l'esame anatomico-patologico e ulteriori indagini di laboratorio mirate all'accertamento della causa di morte (Tabella n. 2).

Ricerca di *Salmonella* sp. (1) – Arricchimento. I campioni di fegato sono stati suddivisi in due aliquote e sottoposti a due diverse modalità di arricchimento. La diluizione osservata è stata di 1/10 e ai campioni è stata aggiunta idonea quantità di Selenito Cistina (SC) e di Mueller-Kauffmann Tetrationato (Mktn). L'incubazione è avvenuta a 37°C per 18-24 ore. **Isolamento.** Osservato il periodo d'incubazione, i campioni sono stati seminati in doppio su terreni solidi Brilliant Green Agar (BGA) e Xilose Lysine Deoxycholate Agar (XLD), inoculando 0,1ml di liquido. Le piastre sono state incubate a 37°C per 18-24 ore.

Identificazione batterica – Le colonie che hanno presentato crescita caratteristica sui terreni utilizzati, sono state trapiantate su Triple Sugar Iron Agar (TSI) per infissione e su Agar Sangue (AS). Dopo incubazione di 18-24 ore, sono stati valutati i seguenti parametri: viraggio di colore, produzione di H₂S e sviluppo di gas su TSI. A partire dalle colonie su AS è stata allestita la prova dell'ossidasi. Le colonie con caratteristiche riconducibili a quelle di *Salmonella* sp. sono state sottoposte ad identificazione mediante galleria API e a sierotipizzazione con agglutinazione rapida su vetrino per la valutazione degli antigeni somatici (O) e flagellari (H).

Verifica mediante PFGE del grado di omologia tra i ceppi di *S. Typhimurium* – L'elettroforesi in campo pulsato (PFGE) è una metodica riconosciuta come "gold standard" per la caratterizzazione degli enteropatogeni, attualmente in uso e standardizzata dal CDC di Atlanta nell'ambito del progetto Pulse-Net (www.cdc.gov/pulsenet/).

L'analisi PFGE consente una caratterizzazione molecolare con la definizione di profili di restrizione denominati "pulsotipi" dei ceppi batterici mediante l'impiego dell'enzima di restrizione specifico per il microrganismo in esame e una successiva elettroforesi in campo pulsato. I profili genomici ottenuti dall'analisi vengono confrontati attraverso l'utilizzo di un software dedicato (BioNumerics Version 6.1, Applied Math - Sint Martens-Latem, Belgio).

I valori di similarità sono stati calcolati con il coefficiente di Dice mentre l'algoritmo UPMGA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Means), con 1.50% di tolleranza e 1.00% di ottimizzazione, è stato impiegato per ottenere il dendrogramma.

I pulsotipi analizzati risultano perciò raggruppati in cluster, visualizzati graficamente all'interno di un dendrogramma e correlati tra loro da una percentuale di similarità attribuita dal software; il 100% di similarità tra due o più pulsotipi indica che i ceppi sono strettamente correlati dal punto di vista genetico. I profili di DNA che differiscono per una o più bande vengono considerati profili distinti.

Il ceppo di *Salmonella* Braenderup è stato utilizzato come marker di peso molecolare come riportato nel protocollo Pulse-Net e in letteratura scientifica (7).

Ricerca tossina botulinica (3,5,6) – Successivamente alla preparazione del campione secondo la metodica in uso presso l'IZS PLV (5,6), è stata eseguita la prova biologica su topino

bianco tipo Swiss mediante inoculo intraperitoneale del campione in esame opportunamente trattato. La morte dei topi inoculati con campione tal quale e campione trattato con tripsina, forniva esito positivo alla prova biologica.

Tossinotipia e conferma – In caso di positività alla prova biologica, si proseguiva con il trattamento del campione con antisieri specifici verso le diverse tossine botuliniche eventualmente presenti e successiva inoculazione intraperitoneale in topino. L'effetto protettivo dell'antisiero si esplicava con la sopravvivenza degli animali inoculati e la valutazione della mortalità osservata forniva pertanto la tipizzazione della tossina botulinica presente (5,6).

Tabella n. 1: attività diagnostica presso l'IZS di Torino in merito al focolaio di salmonellosi e botulismo in provincia di Alessandria.

Data inoltro laboratorio	Tipo campione	Sintomatologia clinica	Area
12 luglio (CASO 1)	3 anatroccoli selvatici	n.d.; rinvenuti morti	2RC Scrivia Cassano
22 luglio (CASO 2)	3 garzette	n.d.; rinvenuti morti	Scolmatore del torrente Grue nello Scrivia
3 agosto (CASO 3)	1 germano reale	n.d.; rinvenuto morto	Scolmatore del torrente Grue nello Scrivia
	1 gabbiano	Astenia, anoressia, diarrea. Assenza di paralisi flaccida. (soppresso)	
9 agosto (CASO 4)	1 anatra selvatica	Paralisi delle ali e delle zampe. Collo penzolante. (soppresso) [nel sito di prelievo, limitrofo ad aree di acqua stagnante, veniva recuperata una decina di altri volatili morti in stato di decomposizione]	Scolmatore del torrente Grue nello Scrivia

Tabella n. 2: risultati delle indagini condotte sui campioni conferiti. [SALM: ricerca Salmonella; BNT: prova biologica tossina botulinica e tossinotipia]

CASO	SALM	BNT
1 (anatre selvatiche)	3/3 POS	3/3 NEG
2 (garzette)	3/3 POS	3/3 POS tipo "C"
3 (germano reale, gabbiano)	2/2 NEG	2/2 NEG
4 (anatre selvatiche)	1/1 NEG	1/1 POS

RISULTATI

Nella tabella n. 2 sono stati riassunti i risultati delle indagini di laboratorio più rilevanti condotte presso l'IZS di Torino. Ai fini di una diagnosi differenziale esaustiva, sono stati condotti esami volti ad escludere la circolazione di agenti virali e l'avvelenamento acuto, con esito costantemente negativo.

L'esame necroscopico ha evidenziato:

Caso 1: gastro-enterite emorragica.

Caso 2: enterite catarrale.

Caso 3: Germano - rottura epatica con conseguente emorragia interna. Assenza di contenuto gastrico.

Gabbiano - assenza di lesioni riferibili a malattia infettiva o parassitaria. Assenza di contenuto gastrico.

Caso 4: modica enterite catarrale, presenza a livello di stomaco ghiandolare di materiale poltaceo nerastro.

DISCUSSIONE

Dati i risultati ottenuti, l'alta mortalità osservata è principalmente riferibile a botulismo aviario tipo C. Tuttavia, è presumibile che l'infezione da *Salmonella* Typhimurium possa essere stata altresì causa di elevata mortalità, visto l'isolamento sistemico di *Salmonella* sp. in animali notoriamente considerati serbatoio naturale (4).

Nel nostro studio, infatti, l'elevato grado di omologia ottenuto in PFGE, nell'ambito dei sierotipi di *S. Typhimurium* isolati da anatre e garzette, indica che la positività non può essere considerata un mero riscontro occasionale di salmonella in uccelli acquatici ma è collegata ad un grave evento morboso in atto, suffragato anche dai riscontri anatomo-patologici (CASO 1, gastro-enterite emorragica).

Pertanto, si può concludere che in casi di elevata mortalità in volatili acquatici è necessario sempre applicare un protocollo diagnostico mirato all'esclusione di infezione salmonellare che, seppur di importanza minore come causa di mortalità nella specie animale considerata, possono avere gravi ripercussioni dirette sull'habitat e indirettamente sugli animali domestici e sulla salute dell'uomo.

BIBLIOGRAFIA

1. AFNOR NF V 08-052 (1997)
2. Avian Botulism in Field Manual of Avian Disease Milton Friend and J. Christian Franson, Technical Editors. U.S. Department of the Interior. U.S. Geological Survey, Washington, D.C. chapter 38: 271-282.
3. Center for Disease Control and Prevention: Botulism in the United States, 1899-1996. Handbook for epidemiologists, clinicians, and laboratory workers, Atlanta, GA. Center for Disease Control and Prevention, 1998.
4. Hughes LA, Shopland S, Wigley P, Bradon H, Leatherbarrow AH, Williams NJ, Bennett M, de Pinna E, Lawson B, Cunningham AA, Chantrey J, 2008. Characterisation of *Salmonella* enterica serotype Typhimurium isolates from wild birds in northern England from 2005 – 2006. BMC Vet Res. Jan 29;4:4.
5. IZS LER Messa a punto e standardizzazione del metodo interno di prova per la ricerca di tossina botulinica in alimenti e matrici biologiche. MP 23/Rev. 0 Marzo 2000.
6. IZS PLV Istruzione Interna n. 15/Rev 2 del 6/10/2008. Modalità di gestione degli animali tabulati
7. Efrain M. Ribot et al., Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. Foodborne Pathogens and Disease Volume 3, Number 1, 2006.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia l'Istituto Superiore di Sanità per la conferma della positività della tossina botulinica tipo C e i tecnici di laboratorio della Struttura Complessa Diagnostica Generale (IZS PLV) per il prezioso contributo tecnico.

DETERMINAZIONI MICROBIOLOGICHE SU VEGETALI DI I E IV GAMMA: DATI PRELIMINARI

Greco S., De Santis P., Flores Rodas E. M., Bogdanova T., Cesarano D., De Angelis V., Di Domenico I., Bilei S.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

KEYWORDS: prodotti IV gamma, I gamma, patogeni

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the microbiological safety of ready-to-eat vegetable products. This paper reports the data obtained by analysis carried out with both microbiological and biomolecular methods. The low percentage of positive results highlights the good quality of the raw materials used and the correct implementation of GMP in the production chain.

INTRODUZIONE

Nel corso degli ultimi anni, l'innovazione della tecnologia alimentare ha portato all'immissione sul mercato di alimenti vegetali con marcate caratteristiche di freschezza (convenience foods). Si tratta, in particolare, di prodotti che, sottoposti a minimi interventi di processo, mantengono inalterate le proprietà organolettiche di freschezza dell'ingrediente di origine. Un'altra denominazione con cui sono conosciuti è "alimenti minimamente trattati" (fresh cut o minimally processed) o IV gamma, secondo la terminologia francese, proposti al consumatore per un uso tal quale (ready to eat - RTE) senza ulteriori interventi di preparazione a livello domestico.

Il consumo dei prodotti di IV gamma in 10 anni, dal 1998 al 2008, risulta incrementato del 200%. Nel 2008, in Italia, il giro d'affari complessivo ha sfiorato i 700 milioni di euro con una produzione di oltre 90 milioni di kg, in netta controtendenza rispetto al calo generale che per l'agroalimentare è stato dello 0,6%. Nei successivi 2 anni lo stesso settore ha registrato un ulteriore incremento dell'8%, in particolare si è assistito ad un boom delle vaschette di verdure pronte all'uso (Fonte Coldiretti, 2011). Si tratta del comparto più dinamico dell'agroalimentare con un kilogrammo e mezzo per persona di verdure già pronte all'uso acquistate all'anno.

Da un punto di vista commerciale i prodotti vegetali possono essere classificati in:

I gamma Ortaggi sfusi

II gamma Ortaggi in barattolo, conserve

III gamma Ortaggi surgelati e congelati

IV gamma Ortaggi preparati, freschi e confezionati

V gamma Ortaggi precotti, grigliati o scottati al vapore senza conservanti o condimenti

VI gamma Ortaggi precotti surgelati (1).

La breve shelf life dei prodotti di IV gamma, variabile tra i 5 e gli 8 giorni, richiede il rispetto della catena del freddo non solo nella fase di commercializzazione ma anche, e soprattutto, dal momento dell'acquisto a quello del consumo. Allo stesso modo è necessario osservare il termine di scadenza, per evitare il determinarsi dei processi degenerativi (quali imbrunimento, rammollimento, ecc) e l'eventuale proliferazione batterica, in particolare di agenti patogeni alimentari.

Fino al 2005 in Europa e in Italia è mancata una norma che regolamentasse la produzione dei vegetali di IV gamma. L'unico testo a cui si faceva riferimento era una linea guida sulle buone norme igieniche, elaborata dalla DGCCRF francese (Direzione Generale della concorrenza, del consumo e della repressione delle frodi) nel 1988 e aggiornata nel 1993. Solo con il successivo Regolamento 2073/2005 (2) entrato in vigore il 1 gennaio 2006, vengono stabiliti alcuni criteri di igiene

e di sicurezza per alcune tipologie di alimenti vegetali (frutta e ortaggi pretagliati e semi germogliati pronti al consumo). La successiva Legge n. 77/11 del 13 maggio 2011 (3) che disciplina la preparazione, il confezionamento e la distribuzione dei prodotti ortofrutticoli di IV gamma prevede l'emanazione, entro tre mesi dalla sua entrata in vigore, di un decreto sui parametri chimico-fisici e igienico sanitari del ciclo produttivo, del confezionamento, della conservazione e della distribuzione dei prodotti ortofrutticoli di IV gamma nonché sulle informazioni che dovranno essere riportate sulle confezioni a tutela del consumatore.

Nel testo della Legge si definiscono prodotti ortofrutticoli di IV gamma i vegetali destinati all'alimentazione umana freschi, confezionati e pronti per il consumo che, dopo la raccolta, sono sottoposti a processi tecnologici di minima entità atti a valorizzarli seguendo le buone pratiche di lavorazione articolate nelle seguenti fasi: selezione, cernita, eventuale monda e taglio, lavaggio, asciugatura e confezionamento in buste o vaschette sigillate, con eventuale utilizzo di atmosfera protettiva.

La proposta del Decreto attuativo, al momento in fase di definizione, introduce oltre a quanto previsto dal Regolamento 2073/2005 e successive modificazioni, solo ulteriori parametri di igiene microbiologica quali carica **mesofila** e *Staphylococcus aureus*.

Si riferisce sui risultati analitici ottenuti su prodotti vegetali di I e di IV gamma oggetto di un monitoraggio nell'ambito di una ricerca corrente finanziata dal Ministero della Salute, che vede tra i partecipanti numerosi altri IZS oltre all'Istituto Superiore di Sanità. Tra gli scopi dello studio anche la definizione degli aspetti microbiologici dei prodotti alimentari vegetali RTE a supporto delle attuali carenti informazioni scientifiche e lo studio di valutazione del rischio.

MATERIALI E METODI

I risultati dell'indagine, che ha come termine il mese di febbraio 2012, sono stati ottenuti dall'attività svolta nel periodo compreso fra novembre 2010 e giugno 2011, su complessivi 147 campioni di vegetali, 102 appartenenti alla I gamma (ossia materia prima utilizzata per la produzione dei prodotti di IV gamma) e a prodotti appena raccolti non ancora sottoposti ad alcuno degli interventi previsti dalla Legge 77/11 e 45 alla IV gamma. I campioni sono stati prelevati nella maggior parte dei casi direttamente presso 3 aziende di produzione e trasformazione site nella regione Lazio che forniscono gratuitamente i loro prodotti mentre i restanti presso la GDO e presso il Centro Agroalimentare di Roma (CARGEST) nel corso di complessivi 26 distinti interventi.

I campioni di materia grezza e quelli di I gamma sono stati sottoposti alle prove microbiologiche il giorno dopo il loro arrivo in Laboratorio, mentre le IV gamma al termine della shelf life indicata dal produttore. Nell'intervallo di tempo compreso tra il prelievo e l'avvio delle prove, i campioni sono stati conservati a temperatura di refrigerazione di 3±2°C.

I prodotti campionati sono riportati nella Tabella 1.

Complessivamente sono state eseguite 1.100 prove.

Tabella 1. Tipologie di prodotti campionati

I GAMMA		IV GAMMA	
Tipologia di prodotto	Numero di I gamma	Denominazione commerciale	Numero IV gamma
Canasta	4		
Indivia riccia	1		
Lattuga cappuccina	3		
Lattuga iceberg	1		
Lattuga romana	5		
Lollo bianco	3		
Lollo rosso	3		
Radicchio chioggia	3		
Radicchio trevigiano	1		
Rucola	6		
Scarola	3		
Valeriana	1		
		Insalata mista	2
		Insalata primavera	1
		Insalata saporita	2
		Insalata tris	1
		Lattughino bianco	2
		Lollo	1
		Radicchio chioggia in foglie	1
		Rucola, Valeriana, Lollo bianco e rosso	2
		Spinacino	1
Indivia riccia	1		
Radicchio	1	Armonia	1
Valeriana	1		
Lattuga iceberg	4	Cuori di iceberg	4
Indivia riccia	1	Indivia riccia	1
Indivia riccia	6		
Indivia scarola	6	Insalata mista	6
Pan di zucchero	6		
Radicchio	6		
Lollo rosso	1	Lattughino misto	1
Lollo bianco	1		
Lattughino verde	6	Lattughino verde	4
Indivia riccia	1		
Indivia scarola	2		
Lattughino bianco	1		
Lattughino rosso	2		
Pan di zucchero	1	Misticanza	3
Radicchio	1		
Rucola	2		
Spinacino	2		
Valeriana	1		
Carote	1		
Indivia scarola	1	Quattro stagioni	1
Pan di zucchero	1		
Rucola	1		
Rucola	7	Rucola	7
Valeriana	4	Valeriana	4
	102		45
			147

Da ogni campione di circa 400g sono stati prelevati: 25g per la ricerca di *Norovirus* mediante PCR real-time; 10g sospesi in 90ml di Buffered Pepton Water (BPW) per la numerazione dei *Campylobacter* spp secondo la norma UNI EN ISO 10272-2:2006 e dei coliformi a 30°C secondo la norma UNI EN ISO 4832:2006; 10g sospesi in 90 ml di Shigella Broth per la ricerca di *Shigella* spp secondo la ISO 21567:2004; 25 g sospesi in 25ml di BPW per la ricerca di *Salmonella* spp secondo la norma UNI EN ISO 6579:2002; 25g sospesi in 225 ml di Half Fraser Broth (HFSB) per la ricerca di *Listeria monocytogenes* secondo la norma UNI EN ISO 11290-1:2005; 25g sospesi in 225 ml di Tryptone Soya Broth modified con novobiocina (mTSB) per la ricerca di *Escherichia coli* O:157 secondo la norma UNI EN ISO 16654:2001; 25g sospesi in 225 ml di Peptone Sorbitol Bile Salts Broth (PSB) per la ricerca di *Yersinia enterocolitica* secondo la norma UNI EN ISO 10273:2003. Da quest'ultima sospensione, mediante stomacher, è stata preparata una seconda sospensione iniziale con IgrasanTM Ticarcillin Potassium Chlorate Broth

(ITC) in modo da ottenere un rapporto di diluizione pari a 1:10. Trascorso il tempo di incubazione previsto per ciascuna procedura, si è proceduto alle semine in piastra per la ricerca dei patogeni e parallelamente 1 ml circa di ciascun brodo è stato processato per la ricerca di *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* ed *E. coli* VTEC mediante l'utilizzo di kit commerciali basati sul metodo PCR Real Time qualitativa. I ceppi di *E. coli* isolati sono stati esaminati per la presenza di fattori di patogenicità: verocitotossina 1 (*vtx1*), verocitotossina 2 (*vtx2*) e intimina (*eae*), mediante metodi PCR end-point. I ceppi di *Campylobacter* sp. sono stati caratterizzati a livello di specie utilizzando un metodo PCR multiplex per la caratterizzazione delle tre principali specie di *Campylobacter* spp: *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*.

RISULTATI

In 5 campioni di vegetali di I gamma sono stati isolati altrettanti ceppi di *Campylobacter* spp, di cui 4 confermati con metodi molecolari. I prodotti risultati positivi sono stati: Pan di zucchero (*C. jejuni*), Radicchio (*C. lari*), Indivia scarola (*C. jejuni*) e Valeriana (*C. lari*). Tutti i prodotti risultati positivi erano ingredienti della stessa IV gamma in cui la ricerca di *Campylobacter* spp (sia microbiologico che biomolecolare) è risultata negativa.

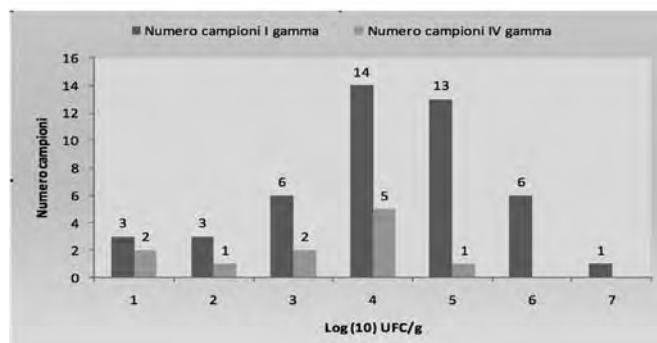
In un solo campione di prodotto di I gamma (Pan di zucchero), è stata riscontrata la presenza di *Norovirus*, mentre la rispettiva IV gamma (4 stagioni) di cui il Pan di zucchero era uno degli ingredienti è risultata negativa per la stessa ricerca.

In 2 campioni, entrambi di IV gamma (Insalata saporita e Gran mix), le prove microbiologiche hanno rilevato la presenza di 2 altrettanti ceppi di *Escherichia coli* O157 risultati privi dei geni di espressione dei fattori di virulenza *vtx1*, *vtx2* e *eae*. La numerazione di *Campylobacter* spp ha fornito sempre un risultato inferiore a 100 ufc/g.

I ceppi dei batteri patogeni isolati sono stati crioconservati.

I coliformi i cui valori medi sono riportati nel Grafico 1, sono stati determinati solo successivamente per confermare titoli elevati ottenuti in regime di autocontrollo in un'azienda.

Grafico 1. Livello medio Coliformi a 30°C



DISCUSSIONE

I riscontri batteriologici positivi sono stati registrati su campioni di vegetali prelevati presso una sola azienda di produzione e trasformazione e presso la GDO, mentre tutti gli altri sono risultati, sotto questo profilo, costantemente negativi.

L'assenza di *Campylobacter* spp e *Norovirus* sui 2 campioni di IV gamma i cui ingredienti sono invece risultati positivi per le stesse ricerche, indica che le norme igieniche applicate in tutte le fasi del processo produttivo risultano efficaci.

La costante assenza di agenti patogeni enterici oltre che di

Listeria monocytogenes, confermano il complessivo giudizio favorevole sulla qualità igienico sanitaria di questi prodotti avvalorando la loro principale caratteristica di ready to eat.

L'isolamento di 2 ceppi di *Escherichia coli* O:157 da altrettanti prodotti di IV gamma prelevati presso la GDO, pur privi dei geni espressione dei fattori di virulenza, sottolinea il rischio sanitario dovuto a possibili contaminazioni da materiale organico di origine animale. Per quanto riguarda i requisiti di igiene il maggior numero di campioni con un titolo di coliformi superiori alle 100 ufc/g appartenenti alla I gamma (40 vs 8), depone a favore dell'efficacia dei processi di lavorazione riguardo l'abbattimento delle cariche microbiche.

In generale comunque i risultati complessivamente favorevoli ottenuti sui campioni di vegetali grezzi e di I gamma fanno ritenere idonee le pratiche agricole applicate.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Mioni R. La qualità igienico-sanitaria dei prodotti ortofrutticoli della IV gamma. Atti Congresso "Tecnologie per una porzione di qualità", Castel d'Azzano (VR) 9 giugno 2011.
- 2) Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione Europea del 15.11.2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari
- 3) Legge 13 maggio 2011, n. 77. Disposizioni concernenti la preparazione, il confezionamento e la distribuzione dei prodotti ortofrutticoli di quarta gamma.

**Lavoro svolto con i fondi RC del Ministero della Salute,
IZSLER 07/08.**

GLI AUDIT INTERNI PRESSO L'ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLE REGIONI LAZIO E TOSCANA

Guzzo S., Palleschi G., Tardiola A., Guarducci M.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

Key words: audit, auditor, miglioramento continuo

ABSTRACT

The authors report the experience of internal audits in the Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, highlighting their importance in the process of continuous quality improvement. They analyze the main internal auditor characteristics in order to obtain efficient and effective audits.

INTRODUZIONE

Le verifiche ispettive interne, denominate anche audit di prima parte, rappresentano un punto fondamentale delle norme UNI CEI EN ISO IEC 17025: 2005 (1) e UNI EN ISO 9001: 2008 (2) e del sistema qualità dell'Istituto Zooprofilattico delle Regioni Lazio e Toscana. Il Responsabile della qualità, quale rappresentante della Direzione aziendale, secondo un piano e una procedura prefissati, si accerta, attraverso gli audit, che i requisiti del sistema di gestione per la qualità siano soddisfatti nel tempo.

La norma di riferimento è la UNI EN ISO 19011: 2003 (3); che rappresenta la linea guida sui principi, la gestione del programma, la conduzione delle verifiche ispettive e la competenza degli auditor.

L'approfondimento del concetto di "programma di audit" e delle "competenze degli auditor" è una novità della UNI EN ISO 19011: 2003 che affronta l'argomento in maniera più esaustiva e puntuale rispetto alle precedenti norme (UNI ISO 30011-1: 1994, UNI ISO 30011-2: 1994, UNI ISO 30011-3: 1994).

Le verifiche ispettive sono eseguite da personale opportunamente addestrato e qualificato, indipendente dalle attività sottoposte a verifica. Gli auditor devono rispettare i principi di fiducia, integrità, riservatezza, discrezione ed avere la capacità di riportare fedelmente e con precisione le evidenze oggettive riscontrate.

MATERIALI E METODI

All'inizio di ogni anno è predisposto un programma che indica le strutture da verificare, gli auditor, eventuali osservatori ed il mese previsto per l'audit.

Il programma è riesaminato più volte nel corso dell'anno. In prossimità della verifica è predisposto il piano di verifica come comunicazione alla struttura aziendale. Gli aspetti esaminati possono comprendere i requisiti tecnici e gestionali della UNI CEI EN ISO IEC 17025: 2005, (1) i requisiti gestionali della UNI EN ISO 9001: 2008 (2) oppure limitarsi a elementi specifici individuati come critici o da approfondire.

Nel 2010 gli audit sono stati condotti da 14 auditor. La loro qualificazione è prevista attraverso la partecipazione a specifico corso di formazione e l'effettuazione nei primi 2 anni di almeno 6 audit come osservatore. La qualifica è mantenuta nel tempo mediante 2 verifiche all'anno e la partecipazione a corsi di aggiornamento.

L'audit è condotto mediante il riscontro di evidenze oggettive della corretta applicazione dei documenti di definizione del sistema qualità e nella normativa di riferimento ed in particolare dell'attuazione e l'efficacia delle azioni correttive e preventive.

Le fonti di informazioni possono essere le interviste con il personale, la verifica dei documenti di registrazione (es. fogli di lavoro, schede di registrazione delle apparecchiature) e di definizione (es. procedure e istruzioni).

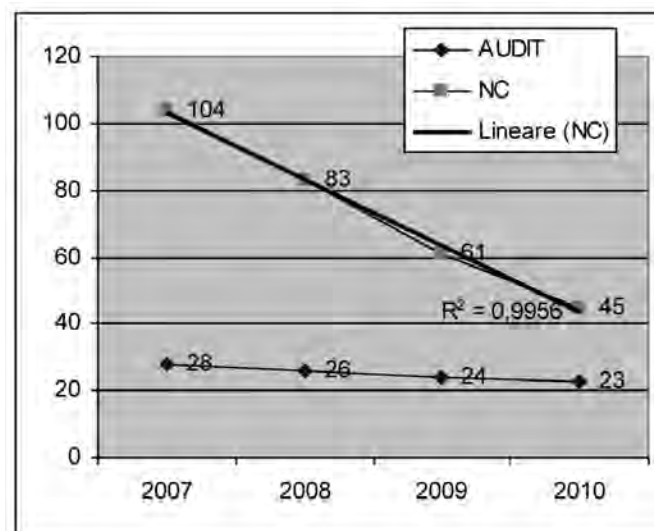
La verifica è suddivisa in 3 fasi: una fase preparatoria, una fase di conduzione in campo e una fase di stesura del rapporto che indica gli eventuali scostamenti (rilevi), le indicazioni per il miglioramento ed un giudizio sintetico sull'andamento del sistema qualità. In base alle risultanze della verifica il responsabile della struttura predispone i trattamenti ai rilievi, le eventuali azioni correttive e/o azioni preventive.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nel 2010 sono stati eseguiti 23 audit interni di cui 22 in base alla UNI CEI EN ISO IEC 17025: 2005 (laboratori e strutture amministrative non certificate) e uno secondo la UNI EN ISO 9001: 2008 (struttura Formazione certificata). Nei laboratori sono stati esaminati principalmente i metodi di prova e per i normati la conformità ai documenti di riferimento. Per ogni verifica ispettiva è stato redatto un rapporto di verifica. In generale non sono emerse situazioni particolarmente critiche. Gli scostamenti più frequenti riguardano la mancanza di alcuni elementi del sistema quali: l'analisi delle cause delle non conformità (NC), il recepimento delle osservazioni in azioni preventive, l'individuazione di elementi di miglioramento. Alcuni documenti non sono costantemente aggiornati e/o revisionati se non in prossimità delle verifiche ispettive.

Nella figura n° 1 è riportato il numero degli audit dal 2007 al 2010 e il numero delle NC rilevate durante gli audit interni dal 2007 al 2010: c'è sicuramente una diminuzione significativa delle NC rilevate nel corso degli anni ($R^2=0,9956$).

Figura n° 1 Rappresentazione del numero di NC e di audit dal 2007 al 2010

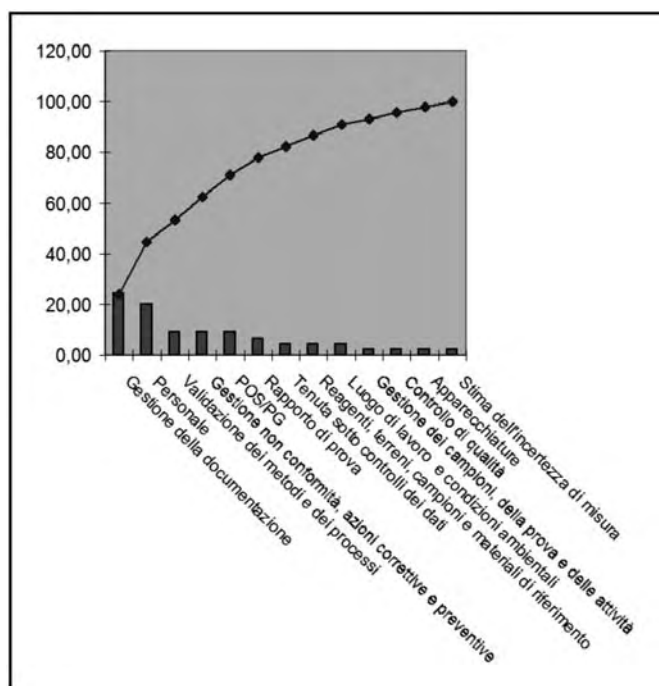


Le NC aperte in seguito agli audit interni nel 2010 sono state 45 contro le 61 del 2009. Questa diminuzione è da attribuire alla competenza del personale delle strutture acquisita nel corso degli anni e una maggiore attenzione nell'applicazione del sistema.

Nella figura n° 2 è rappresentato il diagramma di Pareto degli audit interni del 2010.

Dal diagramma emerge che non c'è un punto critico che da solo determina l'80% delle NC ma sono coinvolti aspetti variabili che non si presentano sistematicamente da un anno all'altro e che quindi influenzano poco l'andamento del sistema.

Figura n° 2: Rappresentazione grafica di Pareto per le NC rilevate negli audit 2010.



L'analisi dei rapporti di audit è un input fondamentale per il riesame del sistema qualità che annualmente predispone la Direzione aziendale. Attraverso l'elaborazione dei dati ottenuti è possibile individuare i punti critici ed adottare efficaci azioni correttive o preventive. L'auditor deve valutare l'efficacia e l'efficienza del sistema e fornire informazioni utili alle strutture e alla direzione per il miglioramento continuo della qualità (UNI EN ISO 9004: 2009) (4).

Pertanto la verifica ispettiva deve essere svolta da persone professionalmente preparate, con adeguate caratteristiche e competenze, senza pregiudizi e interessi verso la struttura verificata ed in modo da assicurare risultati trasparenti e verificabili da parte di altri auditor e dalla Direzione aziendale. La competenza dell'auditor è basata sull'integrazione delle caratteristiche personali e della capacità di applicare le conoscenze ottenute mediante l'istruzione, la formazione e l'addestramento e l'esperienza acquisita (tabella n° 1).

Le caratteristiche individuali considerate negative sono quelle di essere cinico, aver pregiudizi, non essere capace di ascoltare, essere superficiale quindi dare giudizi affrettati, essere polemico o ironico.

L'audit interno è una fase importante dell'applicazione delle norme; deve essere effettuato tenendo conto dell'impatto che ha sulla struttura verificata e degli aspetti relazionali che subentrano. E' necessario quindi tenere presente che

le risultanze potranno diventare elementi importanti per l'individuazione di elementi di miglioramento del sistema.

Tabella n° 1: Concetto di competenza

COMPETENZA	
Capacità di applicare conoscenze e competenze generali	CARATTERISTICHE PERSONALI
<ul style="list-style-type: none"> - conoscenze specifiche per la qualità - istruzione - esperienza di lavoro - formazione e addestramento come auditor - esperienza di audit 	<ul style="list-style-type: none"> - rispettoso dei principi etici, cioè giusto, veritiero, sincero, onesto e riservato - di mentalità aperta, cioè disposto a prendere in considerazione idee o punti di vista alternativi - diplomatico, cioè avere tatto nei rapporti con altre persone - dotato di spirito di osservazione, cioè attivamente consapevole delle attività e dell'ambiente circostante - perspicace, cioè istintivamente percettivo di situazioni e capace di comprenderle - versatile, cioè pronto ad adeguarsi a situazioni differenti - tenace, cioè perseverante, concentrato nel raggiungere gli obiettivi - risoluto, cioè capace di pervenire a conclusioni tempestive basate su analisi e ragionamenti logici - sicuro di sé, cioè capace di agire e comportarsi in maniera autonoma e contemporaneamente di interagire in modo efficace con altri

BIBLIOGRAFIA

- 1) UNI CEI EN ISO/IEC 17025: 2005 "Requisiti per la competenza dei laboratori di prova e taratura"
- 2) UNI EN ISO 9001 (2008): Sistemi di gestione per la qualità. Requisiti + Errata Corrigé 1 2009
- 3) UNI EN ISO 19011 (2003): Linee guida per gli audit dei sistemi di gestione per la qualità e/o di gestione ambientale + Errata Corrigé 1 2004 + Errata Corrigé 2 2005
- 4) UNI EN ISO 9004 (2009): Gestire un'organizzazione per il successo durevole – L'approccio della gestione per la qualità

INDAGINE SULLA PRESENZA DI ACIDO ASCORBICO NELLE PREPARAZIONI DI CARNI FRESCHE NON PRECONFEZIONATE

Immarino M., Di Taranto A.

Struttura Complessa "Chimica" - Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia

Key words: Acido ascorbico, carni fresche, HPLC

SUMMARY

Ascorbic acid is commonly-used food additive admitted in pre-packed fresh meat preparations. This addition is subject to a packaging authorization. In this survey 80 samples of not pre-packed fresh meat preparations has been analyzed in order to evaluate the extent to which not authorized ascorbic acid addition is diffused. The ascorbic acid has been determined by a validated HPLC method. Quantifiable concentrations of ascorbic acid ($> \text{LOQ} = 20.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) were registered in 48 samples confirming not authorized additions and the necessity to more disclose this duty rule.

INTRODUZIONE

L'acido L-ascorbico e gli ascorbati, insieme all'acido citrico ed i citrati, sono gli unici additivi ammessi, dall'attuale Normativa, nelle preparazioni di carni fresche macinate. Per queste sostanze, che rientrano nella categoria degli antiossidanti, non sono previste dosi massime di aggiunta, né di residuo al momento della vendita; come in diversi altri casi, la legge fa riferimento ad un non meglio precisato *"quanto basta"* (1). L'acido ascorbico, oltre ad impedire l'imbrunimento di molti alimenti rallentandone il processo di ossidazione dovuto al contatto con l'ossigeno dell'aria, è un agente antinitrosante, ovvero impedisce la conversione dei nitrati a nitriti. Alle concentrazioni utilizzate nell'industria alimentare, l'acido ascorbico ed i suoi derivati non producono alcun effetto avverso. È importante ricordare che la Normativa specifica che questi additivi possono essere addizionati nelle *"preparazioni preconfezionate di carne fresca macinata"*, ne consegue che per poter impiegare questo additivo, il produttore deve possedere l'apposita autorizzazione al preconfezionamento, rilasciata dalla A.S.L. di competenza. Tale importante sottolineatura è necessaria in quanto spesso gli esercizi commerciali, pur sprovvisti di tale autorizzazione, addizionano queste sostanze alle preparazioni sicuri di essere in regola in quanto l'additivo è consentito dalla Normativa vigente (2). In questo studio, attraverso l'analisi di un numero statisticamente significativo di preparazioni a base di carni macinate (hamburger, carni trite e salsicce fresche) non pre-incartate, prelevate secondo il criterio della casualità presso differenti punti vendita nella città di Foggia, è stata verificata l'eventuale aggiunta (non consentita) di acido ascorbico. Le analisi sono state effettuate mediante una metodica validata in accordo con il Regolamento 882/2004/CE (3) e con la Decisione 657/2002/CE (4), che sfrutta la cromatografia liquida ad elevate prestazioni abbinata alla rivelazione UV a serie di diodi.

MATERIALI E METODI

L'indagine è stata eseguita su n. 80 campioni di preparazioni di carni fresche (Hamburger, carni trite e salsicce fresche) suine, bovine, equine, avicole e miste, non pre-incartate. Le determinazioni analitiche sono state eseguite con un metodo in cromatografia liquida a fase inversa e rivelazione UV-DAD validato in accordo con il Regolamento (CE) N.882/2004. Questo metodo prevede l'estrazione in vortex per 1' di 4g di campione omogeneizzato con 40 mL di tampone fosfato 10^{-2} M, pH 3.5; la miscela viene centrifugata per $10'$ a 3000 r.p.m. ed un'aliquota da circa 5 mL del surnatante viene quindi filtrata con filtri da $0.2 \mu\text{m}$. 20 μL del filtrato

vengono iniettati nel sistema cromatografico costituito da: HPLC Waters™ 2690 Separations Module (Milford, MA) equipaggiato con un rivelatore U.V. a serie di diodi Waters™ 996 PDA Detector (Milford, MA), autocampionatore, modulo di degassaggio e comparto colonna. Le separazioni sono state ottenute utilizzando una colonna LUNA HILIC 4.6x150 mm (Phenomenex, Torrance, CA) operando ad un flusso di $1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ in gradiente di Acetonitrile, Acqua ed Ammonio Acetato 0.1 M, pH 5.8 come riportato in tabella 1. La determinazione quantitativa dell'acido ascorbico eventualmente presente viene rilevata mediante retta di taratura, correggendo il valore ottenuto per il recupero medio (104.2%) stimato in fase di validazione. È importante sottolineare come l'impiego del rivelatore a serie di diodi consente di aumentare notevolmente la specificità e la selettività del metodo; infatti, confrontando lo spettro di assorbimento dello standard con quello del campione, acquisiti nell'intervallo di lunghezza d'onda 200-600 nm, è possibile confermare l'identità dell'analita (Fig. 1).

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'acido ascorbico è un additivo antiossidante ammesso nelle preparazioni a base di carni fresche. Tuttavia bisogna specificare che la Normativa Europea consente l'impiego di questa sostanza solo nelle preparazioni preconfezionate. Dunque, il produttore deve essere autorizzato dalla A.S.L. di competenza a preconfezionare prodotti alimentari. Questa ultima importante sottolineatura è necessaria in quanto, molto spesso nel corso delle ispezioni effettuate, si riscontrano aggiunte di acido ascorbico, anche regolarmente indicate in etichetta, effettuate da supermercati o macellerie non autorizzate al preconfezionamento delle preparazioni alimentari. Tale inottemperanza alla legge deriva dal fatto che i produttori, spesso, non sono al corrente di questo obbligo, ed effettuano l'aggiunta sicuri di essere in regola in quanto l'additivo è consentito ed è regolarmente indicato in etichetta.

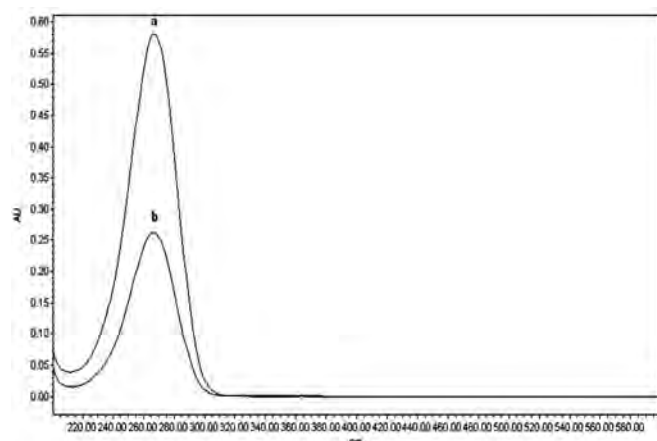
In questa indagine sono state analizzate 80 preparazioni di carni fresche (grafico 1). Di queste, 35 (pari al 43.7%) hanno fatto registrare concentrazioni elevate di acido ascorbico, comprese tra 69.1 e $4169.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Tutte indicavano tra gli ingredienti l'aggiunta di acido ascorbico, molte, però, provenivano da esercizi commerciali non autorizzati al preconfezionamento delle preparazioni alimentari. I rimanenti 45 campioni hanno fatto registrare in 13 casi (pari al 16.3%) concentrazioni superiori al limite di quantificazione (LOQ) del metodo, $20.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; tali concentrazioni sono risultate variabili tra 20.5 e $32.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. In tutte le 13 preparazioni risultava tra gli ingredienti il pomodoro, a volte come pomodoro pelato, altre come conserva. Nei restanti 32 campioni (pari al 40.0%) non sono state registrate concentrazioni quantificabili di acido ascorbico. In figura 2 è riportato un confronto fra tre cromatogrammi ciascuno corrispondente ad una delle tre categorie appena descritte. In considerazione dei risultati ottenuti possono essere fatte due importanti considerazioni: la prima relativa all'evidenza che la normativa non è ancora ben recepita, in tutti le sue sfaccettature, dai produttori di preparazioni di carni fresche macinate e, dunque, se ne rendono necessarie campagne di informazione e divulgazione. La seconda, di carattere legislativo, relativa alla possibilità che possano essere ammesse delle concentrazioni massime di acido ascorbico, nei prodotti non

addizionati con antiossidanti, se nella formulazione sono presenti fonti di acido ascorbico (come il pomodoro). Tale concentrazione massima ammissibile può essere ragionevolmente stimata in $40.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Tabella 2 – Impostazioni del gradiente di eluizione relativo alla metodica HPLC

Time (min.)	%A Acetonitrile	%B Acqua	%C Ammonio Acetato
Init	90	5	5
2.5	90	5	5
7.5	50	45	5
10.0	50	45	5
11.0	90	5	5
15.0	90	5	5

Figura 1 – Spettri di assorbimento dell'acido ascorbico: Soluzione standard $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (a); campione nel quale sono stati riscontrati $27.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ di acido ascorbico (b)



CONCLUSIONI

L'indagine descritta in questo lavoro è stata condotta effettuando analisi di campioni di preparazioni di carni fresche, volte alla determinazione quali-quantitativa dell'acido ascorbico. Si è potuto appurare innanzitutto come la Normativa Europea vigente non sia stata ancora ben recepita dai produttori che, nella maggior parte dei casi, ignorano l'obbligo dell'autorizzazione al confezionamento delle preparazioni alimentari, che sussiste nel caso in cui si decida di aggiungere additivi ai prodotti alimentari non lavorati. Infatti, 35 campioni hanno mostrato concentrazioni elevate di acido ascorbico, comprese tra 69.1 e $4169.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Tutti indicavano tra gli ingredienti l'aggiunta di acido ascorbico tal quale o di altri additivi contenenti acido ascorbico; molti, tuttavia, provenivano da esercizi commerciali non autorizzati al confezionamento. Dunque, si rendono necessarie campagne di informazione e divulgazione della Normativa vigente. I rimanenti 45 campioni hanno fatto registrare in 13 casi concentrazioni superiori al limite di quantificazione (LOQ) del metodo, variabili tra 20.5 e $32.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (in tutte le 13 preparazioni risultava tra gli ingredienti il pomodoro). Nei restanti 32 campioni non sono state registrate concentrazioni quantificabili di acido ascorbico. In relazione a queste basse concentrazioni che talvolta possono essere riscontrate è possibile proporre un limite ammissibile per l'acido ascorbico nelle preparazioni di carni fresche non confezionate. Tale limite può essere ragionevolmente stimato in $40.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, limitatamente alle preparazioni di carni fresche nella cui formulazione è indicata l'aggiunta di fonti di acido ascorbico.

Grafico 1 – Riepilogo dati ottenuti dalle analisi di 80 campioni di preparazioni di carni fresche macinate

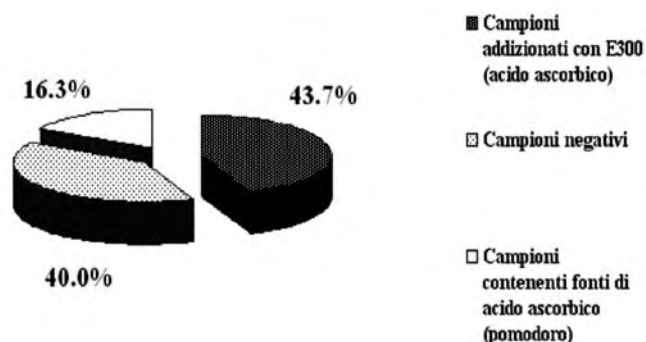
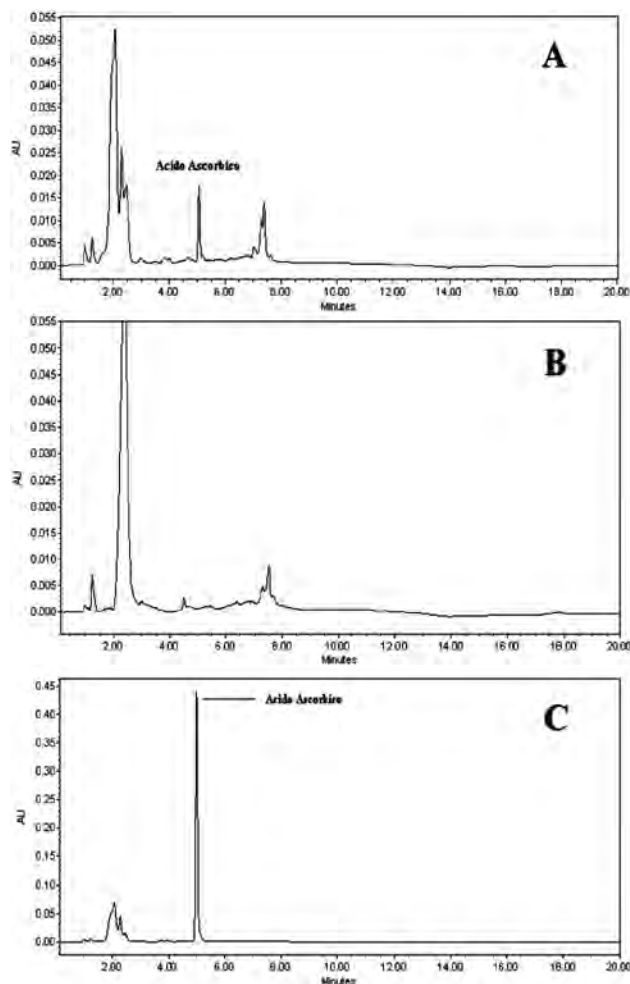


Figura 2 – Confronto tra cromatogrammi relativi a tre campioni di salsicce fresche: uno (A) contenente fonti di acido ascorbico (pomodoro pelato), uno senza acido ascorbico (B), ed uno contenente $830.7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ di acido ascorbico (C)



BIBLIOGRAFIA

- (1) European Commission. Directive (EC) No 2/95. Journal of the European Union, L61:1-53. 20 Febbraio 1995.
- (2) Paturzo F., Bizzozero N. Risultati di un'indagine sul contenuto di additivi in campioni commerciali di carne trita. Ingegneria Alimentare, 3, 15-16, 2001.
- (3) European Commission. Regulation (EC) No. 882/2004. Journal of the European Union, L165, 1-141. 29 April 2004.
- (4) European Commission. Decision (EC) No. 657/2002. Journal of the European Union, L221, 8-36. 12 agosto 2002.

UPL REAL TIME PCR e LAMP: VALUTAZIONE COMPARATIVA DI NUOVE TECNICHE BIO-MOLECOLARI PER LA DIAGNOSI DI PESTE SUINA AFRICANA

Iscaro C.⁽¹⁾, Fernández-Pinero J.⁽²⁾, Leblanc N.⁽³⁾, Rossi E.⁽¹⁾, Giammarioli M.⁽¹⁾, De Mia G. M.⁽¹⁾

⁽¹⁾Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell' Umbria e delle Marche, Perugia, Italia. ⁽²⁾Instituto Nacional de Investigacion Agraria y Alimentaria (CISA-INIA), Valdeolmos, Madrid, Spagna. ⁽³⁾The National Veterinary Institute (SVA), Uppsala, Sweden

Key words: Peste suina africana; real-time PCR UPL; LAMP

SUMMARY

Detection of African swine fever virus (ASFV) can be achieved by virus isolation, immunofluorescent test or molecular analysis such as qualitative and quantitative real time PCRs, which are also recommended by the OIE Manual. Recently additional molecular tools have been developed to detect ASF virus genome: (i) the Universal ProbeLibrary (UPL) is a detection system for real-time PCR based on locked nucleic acid (LNA) probes; (ii) the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a novel approach to nucleic acid amplification which uses a single temperature incubation thereby obviating the need for thermal cyclers. Here, we evaluated comparatively the efficiency of the conventional real time PCR and of the real time PCR UPL and LAMP on serial ten-fold dilutions of ASF virus and on 32 ASFV positive field samples. The UPL real time PCR and LAMP showed a great sensitivity and specificity and could prove to be an attractive alternative to assays based on intercalating dyes or conventional probes.

INTRODUZIONE

La peste suina africana (PSA) è una delle più importanti malattie infettive del suino a motivo della sua capacità di rapida diffusione e delle gravi implicazioni nel commercio internazionale di animali e prodotti di origine animale (7). Dopo l'eradicazione dalla penisola Iberica (1995) (2), la PSA è rimasta confinata nei paesi dell'area sub-sahariana e in Sardegna. Tuttavia, nell'ultimo decennio, l'epidemiologia e la distribuzione della malattia sono cambiate: sono, infatti, aumentati i focolai nei Paesi africani e, a partire dal 2007, la malattia è comparsa in alcuni paesi caucasici (Armenia, Georgia e Azerbaigian) e della Federazione Russa.

La vicinanza dell'Unione Europea (UE) alle zone infette, la mancanza di reali punti di controllo frontalieri in tutta la Federazione Russa, l'endemizzazione dell'infezione in larga parte di questi territori e il coinvolgimento, seppur limitato, sia dei cinghiali, sia delle zecche, rende questa malattia un potenziale rischio per l'UE. Non esiste un vaccino nei confronti di questa infezione e le strategie di controllo e di eradicazione della malattia sono basate esclusivamente sulla diagnosi di laboratorio e sulla rigida applicazione delle misure sanitarie.

Molte tecniche diagnostiche possono essere utilizzate in laboratorio per l'identificazione del virus della PSA. L'isolamento in colture primarie di leucociti suini (6) è sensibile, ma richiede molti giorni e può dare dei falsi negativi nel caso di isolati non emoadsorbenti (3). L'ELISA-Ag può essere utilizzata solo come tecnica di screening e l'immunofluorescenza è particolarmente indicata nelle fasi acute della malattia. Molti test bio-molecolari, come la PCR convenzionale (1) e la real-time PCR (5) sono stati sviluppati negli ultimi anni e adottati per la diagnosi di routine. Recentemente sono state sviluppate nuove

tecniche bio-molecolari quali la real-time PCR che utilizza la Universal ProbeLibrary (UPL) e la loop-mediated isothermal amplification (LAMP) che consente la diagnosi di PSA anche in laboratori non estremamente specializzati e può teoricamente essere impiegata come *on-site* test.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare comparativamente sia su campioni sperimentali che di campo, l'applicabilità di queste due nuove procedure bio-molecolari e definirne le caratteristiche di specificità, sensibilità e ripetibilità.

MATERIALI E METODI

Stipiti di PSA appartenenti rispettivamente al genotipo I (60/SA/1979), II (Armenia2007) e IX (Kenya2005), sono stati utilizzati in diluizione logaritmica da tal quale (T.Q.) a 10^{-9} per valutare la sensibilità e il limite di rilevabilità delle singole metodiche. Un pannello di 32 isolati collezionati da suino e cinghiale infetti, costituito da sospensioni d'organo, sangue e supernatanti cellulari, è stato utilizzato per verificare le *performances* della real-time PCR con probe UPL#162 e della metodica LAMP. Campioni negativi sono stati preparati da omogenati d'organo e sangue ottenuti da suini non infetti. L'estrazione del DNA virale è stata effettuata con il kit commerciale QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) secondo quanto indicato dal produttore. Due nuove tecniche di amplificazione sono state applicate e valutate mediante una analisi comparativa con la real-time PCR descritta da King et al. (5) e raccomandata dal manuale OIE (8): (i) la real-time PCR che utilizza la Universal LibraryProbe #162 (UPL) (Fernandez et al., non pubblicato); (ii) la loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (Leblanc et al., non pubblicato). (i) la UPL real-time PCR utilizza una coppia di primers specifica per un frammento del gene B646L che codifica per la proteina VP72 e una sonda a idrolisi di 8 nucleotidi marcata in FAM (UPL#162) (Roche-Applied Science). Il prodotto di amplificazione è di 68 bp. (ii) la loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (OptiGene Ltd, UK) è un nuovo saggio bio-molecolare in grado di produrre una rapida amplificazione, in condizioni isoterme, di una sequenza target del gene B646L. Utilizza 3 coppie di primers (F3/B3, FIP/BIP, LF/LB) prodotte mediante uno Java-software disponibile sul sito della Eiken <http://primerexplorer.jp/e/>, in presenza di una DNA polimerasi con attività di *strand displacement*.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I saggi bio-molecolari in questione sono stati applicati su diluizioni logaritmiche dei genotipi I, II e IX del virus PSA, e su un pannello di isolati e di campioni clinici. In tabella 1 sono riportati la media dei Ct di tre repliche/campione ottenuti dalla real-time PCR OIE, dalla UPL real-time PCR e dalla LAMP su diluizioni logaritmiche del genotipo I. Risultati sovrapponibili in termini di sensibilità delle singole prove

sono stati ottenuti con il genotipo II e IX.

In tabella 2 sono riportati i risultati dei tre saggi su isolati ottenuti da cinghiali infetti.

La ripetibilità delle singole prove è stata valutata effettuando tre corse indipendenti; ogni singolo campione è stato testato in tre repliche.

La real-time PCR OIE, la UPL real-time PCR e la LAMP hanno tutte mostrato ottime performances in termini di specificità, sensibilità e ripetibilità.

In particolare, la UPL real-time PCR risulta essere specifica, sensibile e di rapida esecuzione. Rispetto alla real-time PCR OIE, ha mostrato performances superiori, essendo in grado di rilevare con più efficienza il DNA virale in campioni con inibenti (ad es. per eccessiva concentrazione di DNA o presenza di emoglobina) e in matrici critiche derivanti da animali selvatici.

Tabella 1 - Sensibilità della real-time PCR OIE, real-time PCR UPL e LAMP su diluizioni logaritmiche di virus PSA genotipo I.

Dil. Virus (60/SA/1979)	real-time OIE Ct	real-time UPL Ct	LAMP Ct
T.Q.	no Ct	19,55	14,76
10 ⁻¹	no Ct	19,57	16,74
10 ⁻²	31,10	22,16	20,31
10 ⁻³	30,40	25,48	23,91
10 ⁻⁴	33,20	29,15	27,70
10 ⁻⁵	37,00	33,14	31,78 (*)
10 ⁻⁶	40,90	35,73	no Ct
10 ⁻⁷	no Ct	no Ct	no Ct
10 ⁻⁸	no Ct	no Ct	no Ct
10 ⁻⁹	no Ct	no Ct	no Ct

(*) Positività riscontrata solo in una replica.

Tabella 2 - Risultati della real-time PCR OIE, real-time PCR UPL e LAMP su campioni di cinghiali.

Campione n.	real-time OIE Ct	real-time UPL Ct	LAMP Ct
7	37,10	29,16	35,02
9	no Ct	22,53	18,21
37	no Ct	no Ct	no Ct
137	no Ct	no Ct	no Ct
41	27,22	23,24	22,92
42	27,49	20,72	19,40
142	no Ct	29,19	21,15
43	28,76	24,52	25,30
143	no Ct	29,96	20,44
44	24,15	20,07	22,87
45	29,02	24,01	31,46

La LAMP si è rivelata un saggio in grado di produrre una rapida amplificazione di una sequenza di DNA target in modo altamente specifico ed in condizioni isotermiche, mostrando quindi caratteristiche di semplicità e facilità di impiego (4). Ha il vantaggio di poter essere applicata in laboratori non specializzati e/o non dotati di strumentazioni complesse o addirittura in laboratori mobili. L'analisi comparativa tra LAMP e UPL real-time PCR ha mostrato che il limite di rilevabilità della prima è leggermente inferiore anche se la capacità di rilevare DNA virale in campioni con inibenti e in matrici critiche è sovrapponibile. In conclusione, si può affermare che UPL real-time PCR e LAMP siano da preferire per sensibilità e duttilità alle real time PCR convenzionali.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Aguero M., Fernandez J., Romero L., Sanchez Mascaraque C., Arias M., Sanchez-Vizcaino J.M. Highly sensitive PCR assay for routine diagnosis of African swine fever virus in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2003 Sep;41(9):4431-4434.
- 2) Arias, M., and J. M. Sánchez-Vizcaino. 2002. African swine fever eradication: the Spanish model, p. 133-139. *In* A. Morilla, K.-J. Yoon, and J. Zimmerman (ed.), Trends in emerging viral infections of swine. Iowa State University Press, Ames.
- 3) Gonzague M., Roger F., Bastos A., Bureger C., Randriamparany T., Smondarck S., Cruciere C. 2001. Isolation of a non-haemadsorbing non-cytopathic strain of African swine fever virus in Madagascar. *Epidemiol. Infect.*, 126, 453-459.
- 4) H.E. James, K. Ebert, R. McGonigle, S.M. Reid, N. Boonham, J.A. Tomlinson, G.H. Hutchings, M. Denyer, C. Oura, J.P. Dukes, D.P. King. 2010. Detection of African swine fever virus by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods*, 164, 68-74.
- 5) King, D.P., S.M. Reid, G.H. Hutchings, S. Grierson, P.J. Wilkinson, L.K. Dixon, D.S. Bastos, and T.W. Drew. 2003. Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *J. Virol. Methods* 107:53-61.
- 6) Malmquist, W.A., Hay D. 1960. Haemadsorption and cytopathic effect produced by African swine fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures. *Am. J. Vet. Res.* 21, 104-108.
- 7) Sánchez-Vizcaino, J. M. 1999. African swine fever, p. 93-102. *In* A. D. Leman, B. E. Straw, W. L. Mengeling, S. Dallaire, and D. J. Taylor (ed.), Diseases of swine, 8th ed. Iowa State University Press, Ames.
- 8) Wilkinson, P. J. 2000. African swine fever, p. 189-198. *In* Manual of standards for diagnostic test and vaccines, 4th ed. Office International des Epizooties, Paris, France.

Progetto di ricerca finanziato dal European Community's Seventh Framework - FP7/2007-2011 (KBEE- 2007-1-3-05 ASFRISK Project)

RICERCA DIRETTA DI VTEC IN MOLLUSCHI BIVALVI PROVENIENTI DA UN BANCO NATURALE

Lamon S., Mureddu A., Marceddu M., Consolati S., Mazza R., Meloni D., Mazzette R.

Dipartimento di Biologia Animale, sez. Ispezione Alimenti, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Sassari

Key words: VTEC, shellfish, screening PCR

SUMMARY

The aim of the present study was to improve a molecular screening test for the direct detection of VTEC in shellfish, collected from a Sardinian growing natural bed and to define the virulence profile of the isolates. Thirty samples of shellfish were analyzed by PCR. Virulence factors of the strains (isolated by IMS) were determined by multiplex PCR. The prevalence of VTEC by direct PCR screening test was 6.6%. According to the multiplex PCR, the DNA from two enrichment broths showed a complete virulence profile, instead in all the strains isolated by culture methods any virulence genes were detected.

INTRODUZIONE

L'Italia è il terzo paese produttore in Europa di molluschi eduli lamellibranchi, dopo la Spagna e la Francia. La produzione riguarda prevalentemente mitili (*Mytilus galloprovincialis* e *edulis*) e vongole veraci (*Tapes semidecussatus* o *philippinarum* e *Tapes decussatus*), cui si aggiungono limitate quantità di ostriche (*Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis*) (8). In Sardegna la maggior parte degli allevamenti ricade in zone di produzione di classe B (Reg. Ce 853/2004). Esistono inoltre aree non ancora classificate, nelle quali si riscontra la presenza di banchi naturali di molluschi.

Le zoonosi alimentari associate al consumo di molluschi bivalvi sono segnalate in tutto il mondo. I molluschi, infatti, in quanto organismi filtratori, sono capaci di concentrare sostanze particolate e contaminanti ad esse associati (microrganismi di origine fecale e patogeni adattati all'ambiente marino, virus, biotossine algali e sostanze chimiche) (1). In particolare, è in aumento l'incidenza di episodi di malattie alimentari legate al consumo di molluschi contaminati da Norovirus e vibroni patogeni, nonostante in molti paesi europei vengano attuati piani di controllo delle zone di produzione, basati sulla determinazione di alcuni criteri microbiologici, quali *E. coli*, il cui numero è utilizzato come indicatore di contaminazione fecale. Tuttavia, alcuni studi (9) hanno dimostrato che essi sono scarsamente predittivi della presenza di microrganismi adattati all'ambiente acquatico (*Vibrio spp.*) e di altri patogeni rilevabili in numero limitato (*E. coli* O157).

E. coli verocitotossici (VTEC) non sono comunemente riscontrati nei prodotti della pesca, tuttavia è stato documentato che molluschi raccolti in zone contaminate da reflui terrestri possono veicolare VTEC ed ETEC (4). Generalmente essi vengono isolati dal tratto gastrointestinale di animali da reddito e, in particolare, ai ruminanti è riconosciuto il ruolo di principale reservoir (2). Un numero significativo di infezioni umane da *E. coli* è causato dal sierotipo O157, principalmente attraverso il consumo di alimenti contaminati, ma anche mediante il contatto con l'ambiente e/o l'utilizzo di acqua (3). VTEC, prevalentemente O157, sono stati isolati in ambienti di allevamento da differenti siti, quali il terreno, il letame, i liquami, gli abbeveratoi, l'acqua per l'irrigazione, le colture e varie attrezzature (1). Dagli ambienti agricoli essi possono essere trasferiti ai corsi d'acqua, soprattutto

durante i periodi di elevate precipitazioni (10) e, da questi diffusi, alle aree costiere. I molluschi presenti in queste zone possono conseguentemente concentrare i patogeni e rappresentare in questo modo un rischio per la salute dei consumatori ed anche, se presenti in banchi naturali, essere utilizzati come indicatori per il biomonitoraggio ambientale. In assenza di dati riguardanti la presenza di *E. coli* Verocitotossici (VTEC) in molluschi bivalvi raccolti presso banchi naturali, gli obiettivi del presente lavoro sono stati: 1) la determinazione della prevalenza dei VTEC in molluschi prelevati in un sito di interesse bionaturalistico, in Sardegna; 2) lo sviluppo di una metodica rapida per la determinazione dei VTEC direttamente sulle matrici; 3) la definizione del profilo di patogenicità dei ceppi isolati, mediante PCR.

MATERIALI E METODI

1. Campioni sottoposti ad esame.

L'indagine è stata condotta con frequenza stagionale, in 4 sedute di campionamento (A, B, C, D), su n.30 campioni di molluschi bivalvi appartenenti alle specie *Tapes decussatus* (n.20 campioni) e *Cerastoderma glaucum* (n.10 campioni). I campioni sono stati raccolti presso un banco naturale, situato in una zona umida considerata di elevato pregio naturalistico, in provincia di Oristano.

2. Allestimento delle brodoculture di arricchimento

Un aliquota di ciascun campione, pari a 10 g di polpa e liquido intravalvare, veniva sottoposta ad arricchimento selettivo in 90 ml di modified-Tryptone Soya Broth (m-TSB), contenente novobiocina [20 mg/l]. Le brodoculture venivano incubate a 37 °C per 18-20 h. Successivamente un'aliquota veniva utilizzata per l'estrazione del DNA, destinato allo screening preliminare, mentre un'altra veniva congelata a -20 °C, dopo centrifugazione e aggiunta di TSB e glicerolo al 5%, per l'eventuale immunoseparazione magnetica (IMS).

3. Screening preliminare dei VTEC mediante PCR

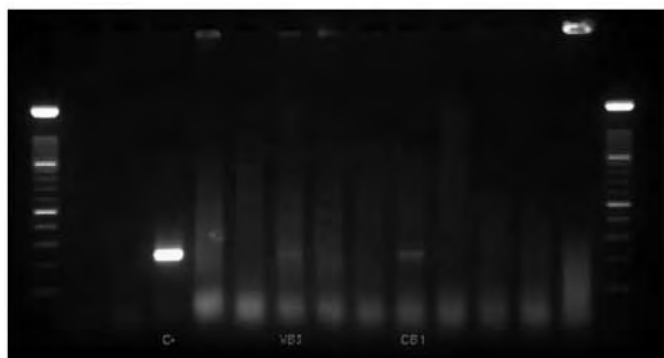
Un'aliquota pari a 1 ml di ciascun arricchimento veniva prelevata e sottoposta a procedura di estrazione del DNA mediante l'utilizzo delle resine Chelex 100 (BioRad, USA). Su ciascuna brodocultura veniva ricercata la sequenza target specifica dei VTEC mediante determinazione dei geni *stx*₁/*stx*₂, secondo la metodica EU Food PCR Project, modificata. A tale scopo è stato utilizzato il set di primers MK1/MK2 che conduce ad un amplificato di circa 230 pb, relativo ad una sequenza comune nei geni *stx*₁ e *stx*₂. Come controllo positivo e negativo della reazione sono stati utilizzati, rispettivamente, i ceppi di riferimento ATCC 35150 e NCTC 12900.

4. Test di conferma

Tutti i campioni risultati positivi alla metodica PCR (presenza di VTEC), sono stati sottoposti alla determinazione qualitativa di *E. coli* O157, O26, O103, O145 ed O111, mediante IMS, con metodo manuale, impiegando le Dynabeads anti-*E. coli* specifiche per i sierotipi ricercati (Invitrogen, USA). Da ciascun complesso Dynabeads-microrganismo è stata effettuata la semina sui seguenti terreni: CT-SMAC (agar

cefexime tellurite sorbitolo di MacConkey) per la ricerca di O157, CT-RMAC (agar cefexime tellurite ramnosio di MacConkey) per O26 ed EHLV agar per i sierogruppi O103, O111 e O145. Le piastre sono state quindi incubate a 37 °C per 24 h. Gli isolati con caratteristiche morfologiche tipiche venivano sottoposti ad identificazione biochimica con il Sistema API (BioMérieux, France). Su tutti gli isolati risultati *E. coli*, è stata eseguita una PCR multiplex per la ricerca dei geni *stx*₁, *stx*₂, *hlyA* ed *eae*, secondo le condizioni descritte da Paton e Paton (6).

Fig. 1 - Screening preliminare dei VTEC mediante PCR.
C+: controllo positivo; VB3, CB1: campioni positivi.



RISULTATI

La metodica PCR utilizzata per lo screening preliminare dei VTEC ha evidenziato una prevalenza complessiva del 6,6% (n. 2/30 campioni positivi). In particolare, sono risultati positivi un campione di Cuore ed uno di Vongola, prelevati nel corso della stessa seduta di campionamento (B) (Fig. 1). A seguito delle prove colturali sono stati complessivamente isolati n.10 presunti *E. coli*; in particolare da: a) CT-SMAC: n.2 O157; b) CT-RMAC n.2 O26. c) EHLV agar: n.2 O103, n.2 O145, n.2 O11. Tutti gli isolati sono risultati *E. coli*. La caratterizzazione molecolare effettuata mediante PCR multiplex ha evidenziato un profilo di patogenicità completo (*stx*₁+, *stx*₂+, *eae*+, *hlyA*+) nel DNA estratto dai brodi di arricchimento, risultati positivi al precedente screening preliminare. Viceversa i ceppi isolati in seguito ad IMS sono risultati negativi per tutti i geni di virulenza ricercati.

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti in questo studio evidenziano che i molluschi prelevati da banchi naturali di zone umide possono essere contaminati da *E. coli* VTEC e suggeriscono la presenza del rischio di inquinamento di origine agro-zootecnica nella zona considerata, che funge anche da bacino di raccolta di acque di bonifica.

La scarsa prevalenza di VTEC nei molluschi esaminati potrebbe essere correlata al basso numero di questi patogeni nell'ambiente costiero, alla presenza di una flora batterica competitiva e anche alla ridotta vitalità *in vitro* dei microrganismi rispetto all'ambiente marino (5).

La screening rapido mediante PCR si è confermato vantaggioso, per la possibilità di individuare la presenza/assenza di VTEC direttamente sulle matrici. Tuttavia la difficoltà di isolamento dei ceppi nei terreni selettivo-differenziali, evidenzia la necessità di ottimizzare

ulteriormente il protocollo operativo, al fine di ridurre le problematiche correlate ad alcuni fattori che possono interferire sulla vitalità e sulla capacità di sopravvivenza e sviluppo dei ceppi. Tra questi vanno considerati lo stress termico (congelamento in attesa dell'IMS), la possibile presenza di sostanze inibitrici della PCR, la disomogeneità di distribuzione del microrganismo all'interno delle differenti aliquote di analisi, la aspecificità dell'IMS, già segnalata da altri autori (5). Tra i possibili interventi di miglioramento si intendono considerare la filtrazione preliminare delle brodoculture, la riduzione dei tempi di congelamento post-arricchimento, l'associazione di altre metodiche di isolamento all'IMS.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Avery, L.M., Williams, A.P., Killham, K., Jones, D.L. (2008). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in waters from lakes, rivers, puddles and animal drinking troughs. *Science of the Total Environment* 389, 378–385.
- 2) Caprioli, A., Morabito, S., Brugere, H., Oswald, E. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary Research* 36, 289–311.
- 3) Chalmers, R.M., Aird, H., Bolton, F.J. (2000). Waterborne *Escherichia coli* O157. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. 88, 124S–132S.
- 4) Duffy, G., Garvey, P., McDowell D.A. (2004). Verocytotoxinigenic *E. coli*. Food & Nutrition Press. Trumbull.
- 5) Gourmelon, M., Montet, M.P., Lozach, S., Le Mennec, C., Pommepuy, M., Beutin, L., Vernozzy-Rozand, C. (2006). First isolation of Shiga toxin 1d producing *Escherichia coli* variant strains in shellfish from coastal areas in France. *Journal of Applied Microbiology* 100(1):85-97.
- 6) Paton, J.C.; Paton, A.W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Journal of Clinical Microbiology* 11, 450–479.
- 7) Potasman, I., Paz, A. and Odeh, M. (2002). Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. *Clinical Infectious Diseases* 35, 921-928.
- 8) Prioli, G. (2008). La molluschicoltura in Italia. En A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. pp. 159–176.
- 9) Savichtcheva, O., Okabe, S. (2006). Alternative indicators of fecal pollution: relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. *Water Research* 40, 2463–2476.
- 10) Williams, A.P., Gordon, H., Jones, D.L., Strachan, N.J.C., Avery, L.M., Killham, K. (2008). Leaching of bioluminescent *Escherichia coli* O157:H7 from sheep and cattle faeces during simulated rainstorm events. *Journal of Applied Microbiology* 105, 1452–1460.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il dott. Paolo Merella, del Dipartimento di Biologia Animale-Università di Sassari.

IDENTIFICAZIONE DI MAMMALIAN ORTHOREOVIRUS TYPE 3 IN *PIPISTRELLUS KUHLLII*¹Lelli D., ¹Moreno A., ¹Lavazza A., ¹Canelli E., ²Tassinari M., ²Soriani A., ¹Fontana R., ¹Barbieri I., ¹Cordioli P.¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna² Area Dipartimentale di Sanità Pubblica Veterinaria - Azienda USL di Ferrara**Keywords:** Mammalian orthoreovirus, *Pipistrellus kuhlii***SUMMARY**

In order to investigate the aspects related to the role of bats as reservoirs of viral agents, it was conducted a virological investigation on a bat colony sampled during the summer 2011. This paper reports the first isolation and molecular characterization of Mammalian orthoreovirus type 3 in *Pipistrellus kuhlii*.

INTRODUZIONE

Il genere Orthoreovirus della famiglia Reoviridae è costituito dalle cinque specie virali *Mammalian orthoreovirus*, *Avian orthoreovirus*, *Reptilian orthoreovirus*, *Baboon orthoreovirus* e *Nelson Bay virus* (1) ed è a sua volta suddiviso nei due sottogruppi orthoreovirus fusogenici e non fusogenici in base alla capacità di formare sincizi sulle colture cellulari (2).

Mammalian orthoreovirus (MRV) è l'unica specie non fusogenica la quale riconosce tre distinti sierotipi e presenta uno spettro d'ospite molto ampio che include potenzialmente tutte le specie di mammiferi, quindi anche i pipistrelli, nelle quali la maggior parte delle infezioni evolve in modo asintomatico. Tuttavia, gli unici orthoreovirus ad oggi identificati nei chiroteri sono di tipo fusogenico, correlati al Nelson Bay virus, e sono stati isolati nei Pteropodidi (3,4,5), pipistrelli del sottordine dei Megachiroteri presenti nei paesi a clima tropicale e comunemente denominati volpi volanti o pipistrelli della frutta per la loro dieta essenzialmente frugivora. Tutti i pipistrelli europei, comprese le 34 specie finora descritte in Italia, appartengono al sottordine dei Microchiroteri e sono a dieta quasi esclusivamente insettivora.

Nell'ambito di uno studio finalizzato ad approfondire gli aspetti legati al ruolo dei chiroteri come reservoir di agenti virali è stata condotta una indagine virologica in pipistrelli provenienti da diverse province del nord Italia. In questo studio viene riportato l'isolamento e la caratterizzazione molecolare di un ceppo di Mammalian orthoreovirus type 3 da una colonia di *Pipistrellus kuhlii* campionata più volte nel corso dell'estate 2011.

MATERIALI E METODI**Campionamento**

Sono stati conferiti all'IZSLER 3 campioni di feci e 3 carcasse di pipistrello provenienti da una colonia che utilizza come sito di rifugio il sottotetto di un edificio del centro storico della città di Ferrara. Le feci sono state raccolte a terra nell'area sottostante la colonia, mentre le carcasse appartengono a soggetti rinvenuti morti dopo essere rimasti intrappolati all'interno dell'edificio.

I campioni di feci giunti al laboratorio sono stati immediatamente processati per i successivi esami virologici. Le carcasse di pipistrello sono state sottoposte ad esame necroscopico nel corso del quale è stata effettuata l'identificazione di specie ed il prelievo dei seguenti campioni:

- testa, per la ricerca del virus della rabbia;
- pacchetto intestinale;
- pool di visceri costituito da polmone, cuore e fegato.

Nella Tabella 1 è riportato l'elenco dei campioni conferiti con i numeri identificativi IZSLER, le date di prelievo e l'identificazione di specie e sesso degli animali.

Tab.1: Elenco e descrizione dei campioni esaminati.

N° prot. IZSLER	Materiale	Data Prelievo	Specie	Sesso /Età
155012/2011	carcassa	23/06/2011	<i>Pipistrellus kuhlii</i>	M adulto
159685/2011	carcassa	29/06/2011	<i>Pipistrellus kuhlii</i>	F giovane
193286/2011	carcassa	09/08/2011	<i>Pipistrellus kuhlii</i>	F adulto
130366/2011	feci	26/05/2011	/	
157069/2011	feci	26/06/2011	/	
164145/2011	feci	04/07/2011	/	

Isolamento virale

I campioni di feci e i campioni d'organo sono stati estratti in Mem antibiotato, chiarificati per centrifugazione e filtrati utilizzando filtri da 0,45µm. Gli omogenati sono stati inoculati su monostrati cellulari Vero e Marc 145 coltivati su piastre da 24 pozzetti e incubati a 37°C in presenza del 5% di CO₂.

Le colture cellulari sono state osservate quotidianamente per evidenziare lo sviluppo di effetto citopatico (ECP). Trascorsi 7 giorni, in assenza di ECP, il criolisato è stato reinoculato in monostrati freschi. Sono stati eseguiti in totale 3 passaggi.

Microscopia elettronica

I campioni di visceri e di feci ed i sovranatanti delle colture cellulari con effetto citopatico sono stati analizzati mediante osservazione in ME in colorazione negativa previa ultracentrifugazione con Airfuge Backman (6).

PCR

I campioni sono stati analizzati tramite RT-PCR utilizzando primers specifici per una regione conservata del gene L1, comune tra i diversi sierotipi di Mammalian Orthoreovirus, secondo il metodo descritto da Leary et al., 2002 (7).

I campioni risultati positivi alla precedente PCR sono stati analizzati tramite una multiplex RT-PCR in grado di amplificare regioni specifiche del gene S1 e di discriminare tra i tre sierotipi di MRV (8).

Sequenziamento ed analisi filogenetica

La caratterizzazione molecolare è stata eseguita attraverso il sequenziamento del gene S1. Il protocollo impiegato ed i primers utilizzati sono quelli descritti da Decaro e coll., 2005 (8). La sequenza ottenuta è stata analizzata in BLAST e confrontata con quella dei ceppi di riferimento ottenuti in GenBank mediante allineamento con il programma CLUSTAL W a parametri di default, tramite il software Lasergene (DNASTAR Inc., Madison,

WI, USA). L'albero filogenetico è stato costruito con il programma MEGA 5.0 utilizzando il metodo della massima parsimonia (9).

RISULTATI

Durante l'esame necroscopico, non sono state rilevate lesioni anatomo-patologiche di rilievo in nessuno dei tre pipistrelli esaminati. Gli esami di laboratorio per la ricerca dei virus della rabbia eseguiti sui cervelli dei tre pipistrelli hanno dato esito negativo.

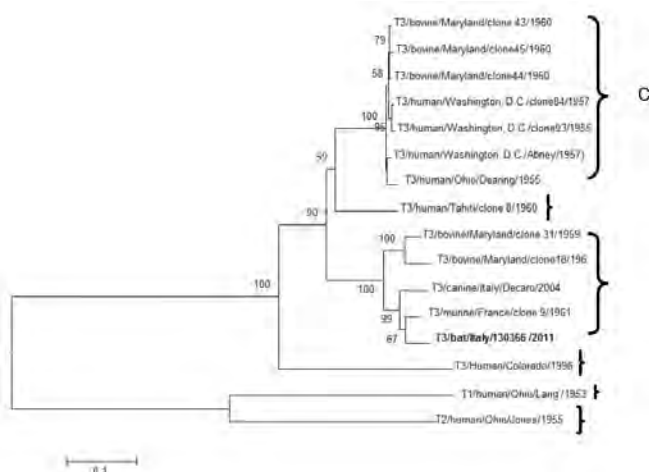
I campioni di feci 130366/2011 e di intestino 155012/2011 inoculati sulle colture cellulari hanno causato evidente effetto citopatico. Nello specifico, per il campione 130366/2011, le prime alterazioni cellulari conseguenti all'infezione virale sono comparse già al primo passaggio (72h post-infezione) sulla linea Marc145 ed ai passaggi successivi anche su Vero. Per il campione 155012/2011 l'ECP è comparso più tardivamente al terzo passaggio e solo su cellule Vero.

La microscopia elettronica ha evidenziato la presenza di numerose particelle virali icosaedriche senza envelope morfologicamente riferibili a reovirus nei sovrantanti delle colture cellulari infettate con il campione di feci 130366/2011 e di intestino 155012/2011. Lo stesso esame eseguito su tutti i campioni originali di estratto di visceri e omogenato di feci ha permesso di evidenziare le medesime particelle virali solo nel campione di feci 130366/2011.

Gli esami in PCR eseguiti in seguito hanno confermato il risultato della microscopia elettronica identificando i due ceppi isolati come Mammalian Orthoreovirus type 3.

L'albero filogenetico derivato dall'analisi delle sequenze del gene S1 mostra come l'isolato 130366/2011 appare correlato al ceppo murino T3C9/61 e si colloca, secondo la classificazione adottata in precedenti studi (8,10), all'interno del lineage E assieme ai ceppi bovini T3C18/61 e T3C31/59 ed al più recente ceppo di cane T3D/04 (Fig.1).

Figura 1. Albero filogenetico del gene S1



DISCUSSIONE

Mammalian orthoreovirus è diffuso a livello mondiale ed è in grado di infettare potenzialmente tutti i mammiferi. Infezioni da MRV sono state descritte nel bovino, nella pecora, nel cavallo, nel maiale, nel cane, nel gatto, nel topo e nei primati umani e non umani (11) e non sorprende pertanto l'identificazione di questi virus anche nei pipistrelli. Tuttavia, quella riportata in questo studio risulta ad oggi, l'unica segnalazione di MRV nei pipistrelli. Considerando che durante l'esame necroscopico, non sono state rilevate nei soggetti deceduti lesioni anatomo patologiche

tali da far presupporre uno stato di malattia associato all'infezione da MRV, determinare quale sia il significato dell'infezione nei pipistrelli risulta difficile. In bibliografia sono riportati diversi casi di infezione da MRV type 3 nell'uomo e negli animali sia di tipo asintomatico sia associati a patologie enteriche, respiratorie o neurologiche (11,12,13), ma il ruolo patogenetico non è ancora stato chiarito. Valutando i risultati di questo studio e quelli ottenuti da una indagine virologica più ampia effettuata presso il nostro laboratorio su 40 campioni di feci di pipistrello campionate in nord Italia, si può concludere che l'infezione da Mammalian Orthoreovirus non è particolarmente diffusa e solo aumentando la casistica si potrà approfondire il ruolo e l'ecologia di questi virus in queste specie.

BIBLIOGRAFIA

1. Chappell J., Duncan R., Mertens P., Dermody T. 2005. Genus Orthoreovirus. In *Virus Taxonomy: Eight report of the International Committee on Taxonomy of Virus*. Edited by Faquet C.M, Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.a. London: Elsevier Academic Press.
2. Duncan R. 1999. Extensive sequence divergence and phylogenetic relationships between the fusogenic and nonfusogenic orthoreovirus: a species proposal. *Virology*, 260:316-328.
3. Du L., Lu Z., Fan Y., Meng K., Jiang Y., Zhu Y., Wang S., Gu W., Zou X., Tu C. 2010. Xi River virus, a new bat reovirus isolated in southern China. *Arch Virol*, 155(8):1295-1299.
4. Thalmann C.M., Cummins D.M., Yu M., Lunt R., Pritchard L.I., Hansson E., Cramer S., Hyatt A., Wang L.F. 2010. Broome virus, a new fusogenic Orthoreovirus species isolated from an Australian bat. *Virology*, 402(1):26-40.
5. Pritchard L.I., Chua K.b., Cummins D., Hyatt A., Cramer G., Eaton B.T., Wang L.F. 2006. Palau virus: a new member of the Nelson Bay orthoreovirus species isolated from fruit bats in Malaysia. *Arch Virol*, 151(2):229-239.
6. Lavazza A., Pascucci S., Gelmetti D. 1990. Rod-shaped virus-like particles in intestinal contents of three avian species *Vet Rec*, 126(23):581.
7. Leary P.L., Erker J.C., Chalmers M.L., Cruz A.T., Wetzel J.D., Desai S.M., Mushahwar I.K., Dermody T.S. 2002. Detection of mammalian reovirus RNA by using reverse transcription-PCR: sequence diversity within $\lambda 3$ -encoding L1 gene. 2002. *Clin Microbiol*, 40:1368-1375.
8. Decaro N., Campolo M., Desario C., Ricci D., Camero M., Loirusso E., Elia G., Lavazza A., Martella V., Buonavoglia C. 2005. Virological and molecular characterization of a mammalian orthoreovirus type 3 strain isolated from a dog in Italy. *Vet Microbiol*, 109:19-27.
9. Tracker E., Janke B. 2008. Swine influenza virus: zoonotic potential and vaccination strategies for the control of avian and swine influenzas. *J Infect Dis*, 197(1):19-24.
10. Dermody T.S., Nibert M.L., Bassel-Duby R., Fields B.N. 1990. Sequence diversity in S1 genes and S1 translation products of 11 serotype 3 reovirus strains. *J Virol*, 64(10):4842-4850.
11. Tyler, K.L. 2001. Mammalian reoviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*. Fourth ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1729-1745.
12. Csiza C.K., 1 74. Characterization and serotyping of three feline reovirus isolates. *Infect Immun* 9:159-166.
13. Tyler K.L., Barton E.S., Ibach M.L., Robinson C., Campbell J. A., O'Donnel S.M., Valyi-Nagy T., Clarke P., Wetzel D., Dermody T.S. 2004. Isolation and Molecular Characterization of a Novel Type 3 Reovirus from a Child with Meningitis. *J Infect Dis* 189:1664-1675.

OTTIMIZZAZIONE E VALIDAZIONE DI UN METODO HPLC/DAD PER LA DETERMINAZIONE SIMULTANEA DI DODICI SULFAMIDICI NEL MUSCOLO

Lo Magro S.¹, Armentano A.¹, Palermo C.², Muscarella M.¹

1. Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia

2. Dipartimento di Scienze Agroambientali, Chimica e Difesa Vegetale, Università degli Studi di Foggia, Foggia

Key words: sulfamidici, validazione, HPLC/DAD

SUMMARY

A multiresidue method for the determination of twelve sulphonamides in muscle samples was optimized and validated. The analysis was performed using liquid chromatography with diode array detection. The procedure has been extensively validated. For all the sulphonamides investigated, linearity, specificity, intra-laboratory precision, ruggedness, CC α values, spectral requirements for DAD detection and assessment of non-compliant results were carefully evaluated according to the criteria reported in the Decision 2002/657/EC and in the SANCO 2004/2726.

INTRODUZIONE

La somministrazione ad animali da reddito di sulfamidici per la cura di varie patologie e per migliorare la loro immuno-resistenza batterica è ampiamente nota. Tuttavia, il mancato rispetto dei tempi di sospensione, l'erronea o la mancata individuazione dei soggetti sottoposti a trattamento antibiotico ed un uso improprio di tali farmaci sono le cause più frequenti della presenza di residui di sulfamidici nella carne destinata all'alimentazione umana. Tali sostanze comportano per la salute umana rischi diretti, legati rispettivamente alla loro nefrotossicità e alla possibilità di indurre allergie, ed indiretti, quali fenomeni di resistenza batterica. Le più comuni metodiche analitiche per la determinazione di residui di tali sostanze in alimenti sono rappresentate da screening test (esempio ELISA [4]) e da metodi di conferma cromatografici come HPLC con rivelazione UV, a fotodiodi e fluorimetria [2, 3] o associata con spettrometria di massa [1]. I sulfamidici appartengono alla categoria B definita nella Direttiva 96/23/CE. Per la matrice muscolo, nel Reg. 37/2010/CE è fissato un limite massimo residuale pari a 100 $\mu\text{g/kg}$ per la somma del contenuto totale dei sulfamidici. Nel documento SANCO 2004/2726 sono inoltre indicati dei criteri inerenti la gestione della non-conformità per le sostanze per le quali è stato fissato un limite di residuo massimo somma. In questo lavoro sono presentate l'ottimizzazione e la validazione di un metodo analitico basato su cromatografia liquida con rivelazione DAD per il riconoscimento simultaneo di dodici sulfamidici. Per il metodo proposto, applicabile a matrici di muscolo di differenti specie animali, sono state valutate le performances analitiche riportate nella Decisione 2002/657/CE. Il rispetto dei criteri di rendimento riportati in normativa permette l'utilizzo della metodica nell'analisi di conferma di campioni sospetti allo screening. La valutazione del CC α per ogni molecola consente di gestire l'espressione di risultati non conformi come indicato nel documento SANCO 2004/2726.

MATERIALI E METODI

Preparazione del campione:

15 g di campione sono stati portati a pH di 5.5, umettando la matrice con 3 ml di acido acetico al 10%. Il campione è stato successivamente estratto con 25 ml di una soluzione cloroformio/acetone (50/50 v/v) e lasciato per 20 minuti in sonificatore. La fase di estrazione è stata ripetuta una seconda volta. Il risultante

estratto, dapprima centrifugato a 3500 giri per 20 minuti a 20° C, è stato privato della fase acquosa. Prima di procedere alla fase di purificazione su colonnine (SPE benzosulfonica SCX 500 mg, 3ml), 40 ml di fase organica sono stati acidificati con 4 ml di acido acetico glaciale. Dopo condizionamento delle colonnine, caricamento del campione, ed opportuno lavaggio della colonnina si sono adoperati per l'eluizione 13 ml di metanolo ammoniacale (2.5% in volume di idrossido di ammonio al 32%). L'eluato ottenuto è stato portato a secco in corrente di azoto a 45° C. Il residuo, ripreso con 500 μl di fase mobile, è stato successivamente iniettato.

Apparecchiatura: Cromatografo liquido Agilent Technologies SL 1200 Series (Waldbronn, Germania).

Reagenti: acetone, acqua per HPLC, metanolo per HPLC, cloroformio, n-Esano, idrossido di ammonio (Baker, Deventer, Olanda); acido acetico glaciale (Carlo Erba, Italia) acetonitrile (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); ammonio acetato (Carlo Erba, Italia), standards di sulfamidici Fluka (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Le soluzioni standard di sulfamidici a concentrazione pari a 1000 mg/l sono state preparate in metanolo. Dalle soluzioni madri, per diluizione con fase mobile, sono state ottenute le soluzioni di lavoro, adoperate per la taratura strumentale.

Condizioni cromatografiche: Colonna cromatografica per HPLC Gemini-Phenomenex-C18 (fase inversa lunghezza: 250 mm, diametro: 4.6 mm, dimensioni particelle 5 μm). Eluizione binaria in gradiente: A = acido acetico/acetato pH=4.5; B = acetone/nitrile/metanolo (50/50 v/v). Flusso: 1 ml/min. Termostato colonna: 40°C. Volume di iniezione: 20 μl . Lunghezza d'onda principale di rivelazione: 270 nm, acquisizione dello spettro DAD tra 220 e 360 nm.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Il metodo analitico è stato ottimizzato in termini di procedura estrattiva e gradiente di analisi. Per ciascun sulfamidico, sono stati poi condotti studi sul riconoscimento spettrale alla luce dei criteri fissati dalla Decisione 2002/657/EC. In Figura 1, è rappresentato, a titolo di esempio, un cromatogramma di uno standard di sulfamidici a 1 mg/kg e un cromatogramma di un muscolo bovino additivato con una soluzione standard a 100 $\mu\text{g/kg}$. Il protocollo di validazione, in linea con le indicazioni della Decisione 657/2002/CE ha consentito di verificare la rispondenza dei parametri analitici ai requisiti vigenti. Sono state verificate le seguenti performances analitiche:

-Specificità: valutata su 20 bianchi campione di muscolo (specie bovina, avicola, suina, equina, ovicaprina, cunicola ed eurialina) sui quali si è verificata l'assenza d'interferenti significativi nell'intervallo di tolleranza massima accettata (pari al $\pm 2.5\%$ rispetto ai tempi di ritenzione degli standard).

-Linearità della risposta: valutata su una curva media in solvente ottenuta iniettando per tre volte 5 soluzioni standard mix di sulfamidici a livelli di concentrazione crescente di 0.25; 0.5; 1; 2; 4 mg/l. Mediante il metodo dei minimi quadrati si è costruita la retta di regressione lineare per ciascun analita valutando il coefficiente

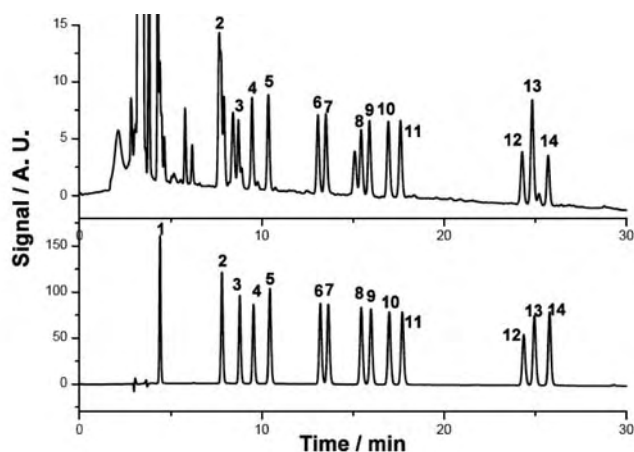
di determinazione ($R^2 > 0.990$), la significatività dell'intercetta e la deviazione standard dei residui.

-Riproducibilità intralaboratorio: La riproducibilità in termini di CV_R % ed il recupero (vedi Tabella 1) sono state valutate fortificando un campione di muscolo bovino con una soluzione standard mix di sulfamidici. I livelli di additivazione adottati per ciascun sulfamidico sono pari a 0.5, 1.0, 1.5 il valore di limite massimo residuale proposto nel Reg. 37/2010 per la somma dei sulfamidici nella matrice muscolo (100 $\mu\text{g/kg}$). Le prove sono state effettuate in condizioni di riproducibilità intra-laboratorio, in tre sedute analitiche diverse (diverso operatore e diversa taratura strumentale). I valori di coefficiente di variazione percentuale, valutati ad ogni livello di validazione e riportati in Tabella 1, soddisfano i criteri della Decisione 657/2002/CE risultando al di sotto di quelli massimi di Thompson ed Horwitz. I risultati, ottenuti ad ogni livello di validazione, corretti per i valori di recupero medio del metodo rientrano nei criteri di esattezza definiti nella Decisione 657/2002/CE.

- Limite di decisione ($CC\alpha$): I valori di $CC\alpha$, valutati secondo quanto suggerito dal documento SANCO 2004/2726 sono compresi nell'intervallo tra 123 e 135 $\mu\text{g/kg}$. Tali valori, corretti opportunamente, sono necessari per la valutazione della non conformità del risultato

- Robustezza: studiata, mediante l'approccio di Youden, su additivi a 100 mg/kg di muscolo suino, ovino caprino, cunicolo, equino ed euralino.

Figura 1: Confronto di un cromatogramma di uno standard dei sulfamidici a 1 mg/kg (in basso) e un cromatogramma di un campione di muscolo bovino additivato a 100 $\mu\text{g/Kg}$ con
1. Sulfanilamide, 2. Sulfadiazina, 3 Sulfatiazolo,
4. Sulfapiridina, 5. Sulfamerazina, 6. Sulfametazina,
7. Sulfadimetossipiridazina, 8. Sulfacoloropiradazina,
9. Sulfamonometossina, 10. Sulfametossazolo, 11. Sulfadoxina,
12. Sulfafenazolo, 13. Sulfadimetossina, 14. Sulfachinossalina. I sulfamidici 1 e 2 non rispondono ai criteri di validazione e pertanto vengono analizzati con un metodo alternativo.



CONCLUSIONE

In questo lavoro, un metodo analitico basato su tecnica HPLC-UV-DAD è stato ottimizzato per la ricerca simultanea di dodici sulfamidici nel muscolo di animali di varie specie. I risultati della validazione, in accordo con la Decisione 2002/657/CE, hanno dimostrato l'affidabilità del metodo nella conferma della presenza di sulfamidici in campioni di muscolo bovino, suino, ovino caprino, cunicolo, equino ed euralino. Infine sono stati presi in considerazione i criteri per stabilire la conformità/ non conformità del risultato in base al valore del limite di legge fissato nel Reg. 37/2010.

Tabella 1: Valori di recupero, di CV_R % percentuale e di $CC\alpha$ per ciascuna molecola di sulfamidico ai tre livelli 50, 100, 150 $\mu\text{g/kg}$. **STZ:** sulfatiazolo, **SDM:** sulfadimetossina, **SQX:** sulfachinossalina, **SP:** sulfapiridina, **SM:** sulfamerazina, **SMX:** sulfametossazolo, **SMM:** sulfamonometossina, **SMP:** sulfametossipiridazina, **SDO:** sulfadoxina, **SNZ:** sulfafenazolo, **SCP:** sulfacoloropiridazina, **SMZ:** sulfametazina, **CV_R %:** deviazione standard relativa riproducibilità intralaboratori, **$CC\alpha$:** limite di decisione

Molecola	Liv. Add. $\mu\text{g/kg}$	Recupero %	CV_R %	$CC\alpha$ $\mu\text{g/kg}$
STZ	50	63	21	128
	100	55	15	
	150	59	15	
SDM	50	72	19	133
	100	71	16	
	150	70	14	
SQX	50	46	22	130
	100	41	16	
	150	45	18	
SP	50	73	21	133
	100	76	16	
	150	71	15	
SM	50	65	21	129
	100	70	15	
	150	69	15	
SMX	50	67	21	130
	100	70	15	
	150	71	14	
SMM	50	65	20	126
	100	70	20	
	150	70	14	
SMP	50	67	20	133
	100	69	17	
	150	66	14	
SDO	50	69	22	130
	100	72	15	
	150	73	16	
SNZ	50	65	20	134
	100	69	17	
	150	68	16	
SCP	50	69	22	123
	100	71	12	
	150	71	12	
SMZ	50	74	20	135
	100	71	17	
	150	71	17	

BIBLIOGRAFIA

- Dong D., Shao B., Wu Y. N., Wu G.H., Xue Y., Xu S.K., Tu M.X., Zhang Y. F., J. Chromatogr. 23 (2005), 404.
- Malintan N.T., Mohd M.A., J. Chromatogr. A, 1127 (2006), 154.
- Kishida K., Furusawa N., J. Chromatogr. A, 937 (2001), 49.
- Sheth H.B, Sporns P., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 73 (1990) 871.

PRESENZA DI TOSSINE ALGALI DEL TIPO P.S.P. (PARALYTIC SHELLFISH POISON) IN MITILI ALLEVATI NELLA REGIONE SARDEGNA E GESTIONE DELLE NON CONFORMITÀ

Lorenzoni G., Arras I., Sanna G., Marongiu E., Piras G., Salza S., Mudadu A., Tedde T., Virgilio S.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari

Key words: mussels, *Paralytic Shellfish Poison* algal toxins, unconformity management

SUMMARY - Presence of *Paralytic Shellfish Poison* algal toxins in mussels bred in Sardinia (Italy), was detected several times in past years. Results of monitoring and surveillance activities carried out from 2009 to 2011, and intervention measures undertaken by competent authority in order to guarantee correct non-compliance management and consumer health protection, are reported in this work.

INTRODUZIONE - Nella Regione Sardegna le problematiche sanitarie associate alla presenza di tossine di origine algale nei molluschi bivalvi, sia di produzione locale che di importazione comunitaria, sono da molti anni all'attenzione della Sanità pubblica veterinaria e medica. La progressiva diffusione di microalghe tossiche produttrici di saxitossine in zone marine costiere italiane utilizzate per l'allevamento dei mitili (1), unitamente al commercio internazionale dei prodotti della molluschicoltura, ha indubbiamente incrementato il livello di rischio associato al consumo di questi prodotti. Come è noto, alcune specie tossiche di microalghe dinoflagellate dei generi *Alexandrium* (in particolare *A. minutum*, *A. catenella*, *A. tamarense*) e *Gymnodinium* (*G. catenatum*) sono in grado, in adatte condizioni ambientali, di moltiplicarsi rapidamente e di produrre tossine che possono accumularsi nelle parti edibili di diversi molluschi bivalvi, rendendoli pericolosi per la salute del consumatore. La sindrome paralitica da molluschi bivalvi (*Paralytic Shellfish Poisoning*) rappresenta un rilevante problema di sanità pubblica, oltre che una importante causa di perdite economiche per gli operatori della molluschicoltura. Il riscontro di queste tossine nei molluschi bivalvi a livelli superiori ai limiti stabiliti dalla normativa sanitaria vigente (Reg. CE n. 853/04) (2) comporta infatti il divieto temporaneo di raccolta e commercializzazione dei prodotti fino al ripristino dei requisiti sanitari. In considerazione delle difficoltà che possono sorgere nella gestione pratica delle emergenze sia a livello di allevamento che di commercializzazione, abbiamo ritenuto utile portare all'attenzione della comunità scientifica veterinaria l'esperienza acquisita a seguito dei numerosi riscontri di positività che in questi anni hanno interessato alcuni allevamenti di mitili della Regione Sardegna (3, 4, 5, 6) e prodotti di importazione comunitaria (7).

MATERIALI E METODI - In attuazione del vigente Piano regionale di sorveglianza delle zone di produzione e di vigilanza alla commercializzazione (8), negli anni 2009, 2010 e nel periodo tra gennaio e luglio del 2011 sono stati sottoposti alla ricerca e determinazione delle tossine algali del tipo P.S.P. rispettivamente n. 628 (di cui 367 in ambito di sorveglianza e n. 261 in vigilanza), n. 671 (di cui 447 in sorveglianza e n. 224 in vigilanza) e n. 460 nel periodo gennaio-luglio del 2011 (di cui n. 309 in sorveglianza e n. 151 in vigilanza) campioni di molluschi bivalvi vivi, in prevalenza mitili, provenienti dai diversi allevamenti della Sardegna. Per la determinazione delle biotossine idrosolubili del tipo P.S.P. è stata utilizzata la prova biologica su topo (*mouse test*) (9).

RISULTATI E DISCUSSIONE - Nelle tab. 1 sono riportati i risultati degli accertamenti effettuati.

Tab. 1. Determinazione biotossine algali del tipo P.S.P. in campioni di molluschi bivalvi vivi prelevati dalle AA.SS.LL della Sardegna (2009, 2010, 2011 Gennaio – Luglio)

Ricerca tossine P.S.P. (<i>Paralytic Shellfish Poison</i>)			
n. campioni positivi (> 800 µg. STX/ Kg p.e.) / totale			
	2009	2010	2011
AA.SS.LL. Serv. Vet.	camp. posit. / totale	camp. posit./ totale	camp. posit./ totale
N° 1 Sassari	0/12	0/4	0/4
N° 2 Olbia	14/317 (4.4%)	5/289 (1.7%)	2/168 (1.2%)
N° 3 Nuoro	0/14	0/10	0/10
N° 4 Lanusei	0/28	0/29	0/29
N° 5 Oristano	0/111	0/90	0/44
N° 6 Sanluri	0/8	0/10	0/7
N° 7 Carbonia	0/33	0/18	0/16
N° 8 Cagliari	0/105	0/221	0/182
Totale Campioni	14/628 (2.2%)	5/671 (0.7%)	2/460 (0.4%)

Nell'ambito dei campioni esaminati, sono risultati non conformi per presenza di tossine algali del tipo P.S.P. in concentrazioni superiori al limite di legge di 800 microgrammi/Kg p.e. n. 14 campioni nel 2009 (2,2%), n. 5 campioni nel 2010 (0,7%) e n. 2 nel 2011 (0,4%), tutti provenienti da allevamenti sottoposti ad attività di sorveglianza a mare, mentre i campioni prelevati in fase di commercializzazione sono risultati tutti negativi.

I campioni non conformi provenivano nel 2009 dalle zone di allevamento di Porto Pozzo e golfo di Cugnana, nel 2010 e nel 2011 dall'area di allevamento di Porto Pozzo.

Dall'esperienza acquisita in questi anni dalle diverse componenti della Sanità pubblica veterinaria (Regione, AA.SS.LL., I.Z.S.) nella gestione delle non conformità emerge anzitutto che è presupposto

fondamentale per l'acquisizione di un livello soddisfacente di sorveglianza in ambito regionale la sussistenza di protocolli di intervento specifici. Ciascuna Azienda U.S.L. competente per territorio di una determinata area classificata deve predisporre un protocollo (da inviare al Servizio della Prevenzione dell'Assessorato regionale alla Sanità e all'I.Z.S.), nel quale devono essere inserite le informazioni essenziali relative all'area classificata di produzione/raccolta/stabulazione dei molluschi bivalvi, quali ad es. il riferimento dell'atto regionale di classificazione, l'identificazione su carta nautica dell'area oggetto della sorveglianza, la tipologia del sistema produttivo (allevamento, banco naturale, zona di stabulazione), la localizzazione e mappatura delle fonti di inquinamento e l'eventuale impatto che le diverse sostanze inquinanti possono avere nei diversi periodi dell'anno (variazioni stagionali, precipitazioni atmosferiche, trattamento di acque reflue, ecc.), le caratteristiche della circolazione delle sostanze inquinanti, le specie di molluschi bivalvi classificate e pertanto oggetto della sorveglianza, il metodo di allevamento utilizzato e la capacità produttiva della zona classificata, la stagionalità della raccolta (se prevista), le tecniche di raccolta utilizzate, l'individuazione e la mappatura delle stazioni di campionamento, il protocollo di attuazione del piano di sorveglianza della zona di produzione e/o stabulazione classificata (strategie di campionamento, frequenza dei campionamenti, analisi previste), la gestione delle emergenze. Relativamente agli aspetti amministrativi e sanitari inerenti la gestione delle non conformità, ogni qualvolta il Laboratorio ufficiale (I.Z.S., A.R.P.A.) riscontri presenza di tossine algali in quantità superiori ai limiti stabiliti, deve con immediatezza comunicare l'esito delle analisi al Servizio sanitario della A.S.L. che ha effettuato il prelievo dei molluschi bivalvi, il quale deve a sua volta notificare l'immediata proposta al Sindaco di adozione di Ordinanza di sospensione temporanea e cautelativa della raccolta di molluschi bivalvi vivi presenti nell'area interessata alla contaminazione, nonché notificare il provvedimento alle Aziende commerciali operanti all'interno della zona interessata per gli adempimenti di competenza, alla Regione (Assessorati alla Sanità e all'Ambiente), agli altri Servizi del Dipartimento di Prevenzione eventualmente interessati. Il Servizio sanitario deve altresì verificare l'eventualità di attivazione del Sistema di Allerta (ai fini della individuazione e del ritiro e/o sequestro delle partite interessate e sospette), intensificare la vigilanza sulla filiera commerciale, avviare un piano di campionamento intensivo nell'allevamento in cui è stata riscontrata la positività e in allevamenti contigui e banchi naturali appartenenti alla stessa zona classificata ed in quelle contermini riguardanti la specie risultata contaminata e altre specie di interesse commerciale. La revoca delle misure restrittive potrà essere richiesta dal Servizio Veterinario territorialmente competente solamente dopo che sia stato accertato il ripristino dei requisiti sanitari, ossia dopo almeno 2 risultati consecutivi al di sotto dei valori limite previsti dalle norme comunitarie separati da un intervallo di almeno 48 ore (10). In caso di riscontro di tossine P.S.P. nel prodotto locale già immesso nel circuito di commercializzazione è necessario attuare immediatamente le procedure di rintracciabilità e di ritiro/ richiamo del prodotto, richiedere l'ordinanza sindacale di divieto di raccolta nell'area di provenienza e intensificare i controlli nei centri di depurazione e di spedizione interessati (CDM-CSM). Nei casi in cui il riscontro di tossine riguardi prodotti di provenienza comunitaria o extracomunitaria, risulta evidente che sono venute meno le garanzie sanitarie che il Paese speditore dei prodotti avrebbe dovuto assicurare (il produttore in regime di autocontrollo, l'Autorità sanitaria in sede di controllo ufficiale) prima della spedizione dei prodotti. Nelle situazioni di riscontro di non conformità dei prodotti a destinazione, l'U.V.A.C. può

disporre il respingimento della merce e il vincolo sanitario con controlli rafforzati sulle successive partite di analoga tipologia e provenienza, oltre che attivare il sistema di allerta comunitario, mentre l'autorità sanitaria locale può disporre il sequestro e la successiva distruzione delle merci non conformi. Il Ministero della Salute ha disposto in proposito che il campionamento del prodotto deve essere effettuato al momento dell'arrivo, prima di qualsiasi eventuale manipolazione o immersione, ossia direttamente dai mezzi di trasporto. Dalla nostra esperienza è emersa l'importanza, ai fini di una efficace attività di prevenzione a tutela dei consumatori e degli stessi produttori, di una puntuale e rigorosa applicazione di Piani sanitari che prevedano un adeguato controllo quali-quantitativo del fitoplancton potenzialmente tossico presente nelle acque adibite alla molluschicoltura e delle biotossine algali nei molluschi bivalvi, una costante attività di vigilanza nel circuito commerciale, l'applicazione di protocolli operativi condivisi, un adeguato coordinamento tra gli operatori del controllo ufficiale e un completo coinvolgimento degli operatori commerciali del settore.

BIBLIOGRAFIA

1. A.Milandri, M.Cangini, A.Costa, M.G.Giacobbe, R.Poletti, M.Pompei, E.Riccardi, S.Rubini, S.Virgilio, S.Pigozzi (2008) – Caratterizzazione delle tossine P.S.P. (*Paralytic Shellfish Poisoning*) in mitili raccolti in differenti aree marine italiane. Atti 39° Congresso Soc. It. di Biologia Marina. Cesenatico (FC), 9-13 giugno, 38 - 41
2. Reg. (CE) n. 853/2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale
3. Virgilio S., Marongiu E., Pisanu M., Mancuso R., Piras A., Virdis F., Saba A., Lorenzoni G., Rosa M.N., Carusillo F., Arras I., Sias S., Poletti R. (2003) – Riscontro di biotossine algali del tipo P.S.P. (*Paralytic Shellfish Poison*) in mitili allevati nel golfo di Olbia, Sardegna. Atti XIII Conv. Naz. A.I.V.I., Montesilvano (Pescara), 6-7-8 giugno, 209 - 213
4. Virgilio S., Marongiu E., Piras A., Pisanu M., Lorenzoni G., Carusillo F., Pes A., Rosa M.N., Canu A., Puggioni G., Sias S., Navone A., Poletti R. (2004) – Evoluzione della contaminazione da biotossine algali del tipo P.S.P. (*Paralytic Shellfish Poison*) in mitili allevati nel golfo di Olbia, Sardegna. Atti XIV Convegno Naz. A.I.V.I., Santuario di Vicoforte (CN), 4-5-6 giugno, 43 - 49
5. Virgilio S., Marongiu E., Lorenzoni G., Carusillo F., Tedde T., Pes A., Rosa M.N., Serra S., Pes P., Achenza A., Canu A., Puggioni G. (2005) – Ricerca di tossine algali del tipo P.S.P. (*Paralytic Shellfish Poison*) in mitili e echinodermi commestibili della specie *Paracentrotus lividus*. Atti XV Conv. Naz. A.I.V.I., Tirrenia (PI), 16--18 giugno, 299 - 304
6. Virgilio S., Lorenzoni G., Marongiu E., Tedde T., Terrosu G., Campus G., Rosa M.N., Mura A., Delogu P., Piras M. (2009) – Riscontro di tossine algali del tipo P.S.P. (*Paralytic Shellfish Poison*) e gestione delle non conformità. Atti XIX Conv. Naz. A.I.V.I., Perugia, 24-26 giugno 2009
7. Virgilio S., Pisanu M., Lorenzoni G., Carusillo F., Pes A., Tedde T., Terrosu G., Rosa M.N., Canu A., Poletti R. (2006) - Rischio sanitario da biotossine algali del tipo P.S.P. (*Paralytic Shellfish Poison*) in molluschi bivalvi oggetto di scambi intracomunitari Atti XVI Convegno Naz. A.I.V.I., Bari, 22-23-24 giugno, 262 - 267
8. Piano regione Sardegna di Sorveglianza periodica delle zone di produzione e stabulazione dei molluschi bivalvi vivi e di Vigilanza e Controllo sanitario della produzione e commercializzazione, anno 2008 (Det. D.G. – S.P. n. 1067 del 21/12/2007) e successivi
9. A.O.A.C. Official Method 959.08 in "Official Methods of Analysis of AOAC International, 17 ed. AOAC International; Horwitz, W., ed.; Gaithersburg, M.D., 2000.
10. Reg. (CE) n. 854/04 che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano.

ABORTO DA VIRUS DELLA DIARREA BOVINA TIPO 3

Lucente M.S., Mari V., Sciarretta R., Cirone F., Larocca V., Amorisco F., Lorusso E., Buonavoglia C.¹, Decaro N.¹

¹Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Facoltà di Medicina Veterinaria di Bari, Valenzano (BA)

Key words: Bovini, Virus della diarrea virale bovina tipo 3, Aborto

SUMMARY

An outbreak of abortion affecting eight multiparous cows was associated to bovine viral diarrhoea 3 (BVDV-3) infection. Viral RNA and antigens were detected in foetal tissues by molecular and antibody-based methods, respectively. At the genetic level, the virus displayed the closest relatedness to Italian and South American prototype BVDV-3 strains.

INTRODUZIONE

I virus della diarrea virale bovina (BVDV) appartengono alla famiglia *Flaviviridae*, genere *Pestivirus*. Si tratta di virus ad RNA monocatenario, a polarità positiva, codificante per una poliproteina, che è scissa, ad opera di proteasi cellulari e virali, in proteine strutturali (C, E^{ms}, E1, E2) e non strutturali (N^{pro}, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B). In base all'attuale classificazione dell'*International Committee on Taxonomy of Viruses* (<http://www.virustaxonomyonline.com>), il genere *Pestivirus* comprende quattro specie riconosciute: BVDV-1, BVDV-2, virus della Border disease (BDV), virus della peste suina classica (CSFV). A queste è stato proposto di aggiungere una quinta specie, *Pestivirus della giraffa*. Attualmente, pertanto, si riconoscono due distinte specie di BVDV, BVDV-1 e BVDV-2, le quali risultano differenziabili su base genetica ed antigenica. Nel 2004 un pestivirus atipico è stato isolato da un lotto di siero fetale bovino originario del Brasile. Questo virus, D32/00_“HoBi”, è stato proposto come una nuova (sesta) specie di *Pestivirus*, BVDV-3 (1). Altri stipiti pestivirus “Hobi”-like sono stati identificati in Sud America in una coltura cellulare probabilmente contaminata da siero fetale bovino infetto e nel sangue di una bufala (2). L'analisi comparativa delle sequenze disponibili in banche dati accessibili on-line (GenBank) ha mostrato che tali virus rappresentano una nuova specie, BVDV-3, all'interno del genere *Pestivirus* (3). Il primo stipite BVDV-3, il cui genoma è stato sequenziato interamente, è stato il ceppo Th/04-KhonKaen, isolato da un siero bovino durante un'indagine epidemiologica per BVDV in Thailandia. Tuttavia, anche in questo caso non è noto se il virus fosse associato o meno a manifestazioni cliniche (4). Uno stipite BVDV-3 è stato isolato nel 2010 da un grave focolaio di malattia respiratoria in un allevamento bovino della Calabria (5). Il virus, 1/10-1-Italy, ha causato malattia in vitelli di 6-7 mesi di età e l'analisi di sequenza dell'intero genoma ha dimostrato che esso è maggiormente correlato, dal punto di vista genetico, agli stipiti di origine brasiliana che al prototipo thailandese. Nel presente lavoro si riporta la caratterizzazione di uno stipite BVDV-3 isolato da feti bovini abortiti.

MATERIALI E METODI

Gli aborti sono stati osservati in giugno 2011 nello stesso allevamento di bovine da latte della Calabria già interessato dalla malattia respiratoria. L'aborto ha riguardato 8 bovine pluripare gravide da 4-6 mesi, le quali non hanno manifestato alcun segno prodromico prima dell'aborto, né sequele dopo l'aborto stesso. Due feti abortiti (280/11-A e 280/11-B) sono stati inviati ai nostri laboratori, dove sono stati prelevati frammenti degli organi interni per le prove diagnostiche. Sono stati effettuati test molecolari per la identificazione dei principali agenti abortigeni della specie bovina, quali *Chlamydophila* spp., *Leptospira* spp., *Coxiella burnetii*,

Salmonella spp., *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Brucella* spp., pestivirus, bovid herpesvirus 1 e virus della bluetongue. La ricerca dei pestivirus è stata effettuata mediante due distinti protocolli di RT-PCR (6,7). La quantificazione di BVDV-3 nelle placente e negli organi dei feti abortiti è stata invece ottenuta mediante un test real-time RT-PCR specifico (8).

Sezioni al criostato degli organi contenuti i titoli virali più elevati (polmone e milza) sono state sottoposte a test di immunofluorescenza indiretta (IFI) con anticorpi monoclonali anti-NS3. L'isolamento virale è stato tentato dal polmone del feto 280/11-A utilizzando cellule in linea continua di rene bovino MDBK. Le regioni genomiche maggiormente informative (E2, 5' UTR, N^{pro}) sono state amplificate in PCR (4,5). I prodotti PCR sono stati inviati alla BaseClear B.V. (Leiden, Paesi Bassi) per il sequenziamento diretto in entrambe le direzioni. Le sequenze ottenute sono state assemblate ed analizzate utilizzando il software BioEdit e gli strumenti di analisi dell'NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e dell'EMBL (<http://www.ebi.ac.uk>). Tali sequenze sono state confrontate con le analoghe sequenze di stipiti pestivirus di riferimento. Le stesse regioni sono state sottoposte ad analisi filogenetica, la quale è stata condotta utilizzando il software MEGA4 ed i metodi neighbor-joining e massima parsimonia e fornendo un supporto statistico mediante bootstrapping pari a 1000.

RISULTATI

Tutti i campioni analizzati sono risultati positivi ad entrambi i test RT-PCR per la ricerca di pestivirus (6, 7) e sono stati caratterizzati come BVDV-3 da un protocollo recentemente messo a punto per la identificazione di tutte e tre le specie BVDV (7) (Fig. 1A). I titoli virali, calcolati mediante real-time RT-PCR specifica (8), erano compresi tra $4,31 \times 10^2$ (rene del feto 280/11-B) e $5,78 \times 10^4$ (polmone del feto 280/11-B) copie di RNA μl^{-1} di estratto. Gli esami molecolari hanno escluso la presenza negli stessi campioni di altri agenti abortigeni.

Il test IFI ha evidenziato la diffusa presenza degli antigeni virali nei tessuti esaminati (Fig. 1B).

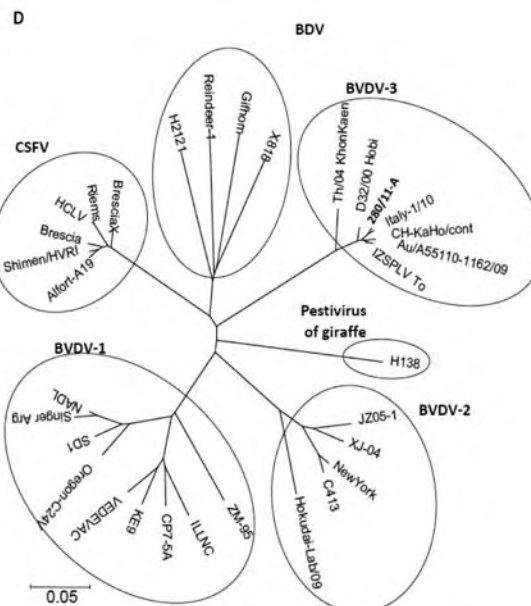
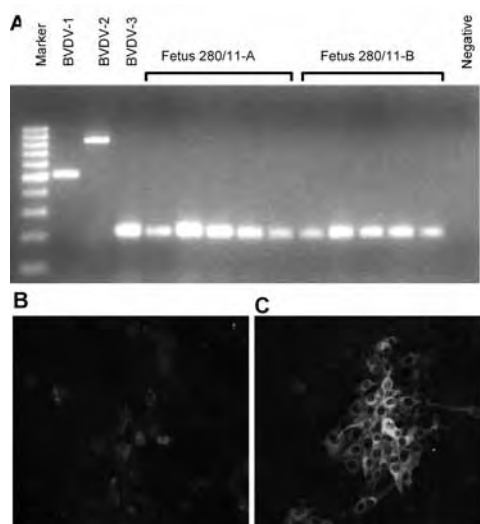
Le colture di MDBK inoculate con l'omogenato del polmone del feto 280/11-A non hanno mostrato effetto citopatico, ma la replicazione virale è stata dimostrata mediante test IFI con anticorpo monoclonale anti-NS3 e mediante real-time RT-PCR BVDV-3 specifica (Fig. 1C).

Mediante analisi di sequenza delle regioni E2, 5' UTR e N^{pro}, lo stipite Italy-280/11-A è risultato strettamente correlato al prototipo italiano Italy-1/10-1, isolato oltre un anno prima nello stesso allevamento. Mediante analisi filogenetica ottenuta con il metodo neighbor-joining sulle sequenze ottenute e su analoghe sequenze di stipiti pestivirus di riferimento, sono risultati evidenti sei cluster monofiletici (Fig. 1D): BVDV-1, BVDV-2, BVDV-3, BDV, CSFV e *Pestivirus della giraffa*. Nell'ambito di questo albero, lo stipite Italy-280/11-A ricade nello stesso gruppo del virus Th/04_KhonKaen, il quale è nettamente separato dagli altri membri del genere *Pestivirus*. Tuttavia, nell'ambito del cluster BVDV-3, gli stipiti italiani segregano con gli stipiti sudamericani. La stessa topologia è stata ottenuta con il metodo della parsimonia in tutte le regioni analizzate.

DISCUSSIONE

Sebbene BVDV-3 sia stato identificato da più di sette anni (1), casi di infezione naturale sono stati riportati solo sporadicamente (2,5,9) e, ad oggi, esiste una sola segnalazione di malattia clinicamente manifesta associata ad infezione da BVDV-3 (5). Sequenze 'Hobi'-like sono state identificate in due feti abortiti in Brasile, ma nulla è noto riguardo i dati anamnestici e la caratterizzazione del virus (9). Nella presente nota è stato descritto un focolaio di aborto associato ad infezione sostenuta da BVDV-3. Il virus è stato identificato mediante metodiche molecolari ed isolato su colture cellulari. La completa caratterizzazione dell'isolato virale è stata ottenuta mediante dimostrazione degli antigeni nei tessuti infetti ed analisi di sequenza di frammenti genici. Considerato che nei feti non sono stati identificati altri comuni agenti abortigeni della specie bovina, gli aborti sono stati verosimilmente causati dalla infezione sostenuta da BVDV-3. Anche se il potenziale patogenetico di BVDV-3 non è ancora del tutto chiaro (immunotolleranza? Biotipo citopatogeno?), l'infezione sperimentale di animali non gravidi ha mostrato che questo virus è in grado di determinare la comparsa di sintomi respiratori, febbre e lieve leucopenia nei bovini e negli ovini, mentre i suini, pur essendo sensibili all'infezione, non sviluppano sintomatologia clinica (10). La possibilità che BVDV-3 rappresenti un'ulteriore minaccia per l'apparato genitale della bovina rende quanto mai urgente l'adozione di misure specifiche di profilassi, predisposte sulla base delle caratteristiche patogenetiche ed immunologiche di questo virus ed attuate utilizzando test diagnostici specifici.

Fig. 1. Identificazione di BVDV-3 in feti bovini abortiti. A. Elettroforesi in gel di agarosio dei prodotti di amplificazione ottenuti mediante protocollo nested PCR di caratterizzazione (7). Corsia 1, marker GeneRuler 100bp DNA Ladder (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Germany); corsia 2, BVDV-1 stipite NADL; corsia 3, BVDV-2 stipite 232/02; corsia 4, BVDV-3 stipite Italy-1/10-1; corsie 5-10, campioni tissutali (placenta, polmone, milza, fegato, rene) del feto 280/11-A; corsie 11-15, campioni tissutali (placenta, polmone, milza, fegato, rene del feto 280/11-B; corsia 16, controllo negativo (milza di vitello negativo per BVDV). **B.** Polmone del feto 280/11-A: test di immunofluorescenza. **C.** Cellule MDBK inoculate con il polmone del feto 280/11-A: test di immunofluorescenza. **D.** Albero filogenetico costruito con il metodo neighbor-joining sulle sequenze del gene *N^{pro}* dei membri del genere Pestivirus. Gli asterischi indicano un elevato supporto statistico per il corrispondente nodo (valori di bootstrap pari al 75-100%). La barra rappresenta il numero di sostituzioni nucleotidiche per sito.



BIBLIOGRAFIA

- Schirrmeyer H, Strebelow G, Depner K, Hoffmann B, Beer M. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *J. Gen. Virol.* 2004; 85:3647-52.
- Stalder HP, Meier P, Pfaffen G, Wageck-Canal C, Rüfenacht J, Schaller P, et al. Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. *Prev. Vet. Med.* 2005; 72:37-41.
- Liu L, Xia H, Wahlberg N, Belák S, Baule C. Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. *Virology* 2009; 385:351-7.
- Liu L, Kampa J, Belák S, Baule C. Virus recovery and full-length sequence analysis of atypical bovine pestivirus Th/04_KhonKaen. *Vet. Microbiol.* 2009; 138:62-8.
- Decaro N, Lucente MS, Mari V, Cirone F, Cordioli P, Camero M, Sciarretta R, Losurdo M, Lorusso E, Buonavoglia C. Atypical pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17:1549-52.
- Sullivan DG, Akkina RK. A nested polymerase chain reaction assay to differentiate pestiviruses. *Virus Res.* 1995; 38:231-9.
- Decaro N, Sciarretta R, Lucente MS, Mari V, Amorisco F, Cordioli P, Parisi A, Buonavoglia C. A nested PCR approach for unambiguous typing of pestiviruses infecting cattle. *J. Virol. Methods*, submitted.
- Liu L, Xia H, Belák S, Baule C. A TaqMan real-time RT-PCR assay for selective detection of atypical bovine pestiviruses in clinical samples and biological products. *J. Virol. Methods* 2008; 154:82-5.
- Cortez A, Heinemann MB, De Castro MG, Soares RM, Pinto AM, Alfieri AA, Flore SEF, Cerqueira LR, Richtzenhain IJ. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5'-UTR region. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 2006; 26:211-6.
- Decaro N, Mari V, Lucente MS, Sciarretta R, Moreno A, Armenise C, Losurdo M, Camero M, Lorusso E, Cordioli P, Buonavoglia C. Experimental infection of cattle, sheep and pigs with 'Hobi'-like pestivirus. *Vet. Microbiol.*, in press.

RINGRAZIAMENTI: Il presente studio è stato realizzato grazie ai finanziamenti della Ricerca di Ateneo 2010, progetto "Epidemiologia dei pestivirus atipici (BVDV-3) in Italia".

INDAGINE SULLA PRESENZA DI *COXIELLA BURNETII* IN FETI BOVINI E BUFALINI NELLA REGIONE CAMPANIA

Lucibelli M. G.¹, Auriemma C.¹, Borriello G.¹, Alfano F.¹, Gallo A.¹, De Carlo E.², Galiero G.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Dipartimento di Sanità Animale, Portici (NA);

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Sezione Diagnostica di Salerno-Centro di Referenza Nazionale sull'igiene e le tecnologie dell'allevamento e delle produzioni bufaline

Key words: *C. burnetii*, PCR

SUMMARY

Q fever is a worldwide zoonosis caused by *C. burnetii*. Domestic ruminants are the main reservoirs of infection and source of contamination for humans. The detection of *C. burnetii* in bovine and water buffalo (*Bubalus bubalis*) fetuses collected from farms located in the Campania region showed a presence of 47% and 29%, respectively, in subjects negative to other aetiological agents. These results indicate that Q fever is a widespread disease, and proper monitoring plans would be necessary to set effective control and prophylaxis activities.

INTRODUZIONE

La febbre Q è una zoonosi causata da *Coxiella burnetii*, un batterio intracellulare diffuso in tutto il mondo e a lungo ignorata. *C. burnetii* può infettare una grande varietà di animali, tra cui ruminanti, cani, gatti, primati, roditori selvatici, rettili, anfibi, uccelli, pesci e zecche (1, 8). Tra i ruminanti domestici, bovini, ovini e caprini sono i principali reservoir di infezione e sono quindi tra le principali fonti di infezione per l'uomo. Le modalità di contagio da *C. burnetii* sono svariate, e quella principale per l'uomo è costituita dall'inalazione di particelle infette. La trasmissione del batterio attraverso aerosol contaminati può avvenire mediante contatto diretto con animali infetti, o, in modo particolare, con i prodotti del parto, quali liquido amniotico e placenta. L'estrema resistenza di questo patogeno agli agenti esterni lo rende persistente nell'ambiente (3). Le zecche non sono in grado di trasmettere l'infezione all'uomo, ma possono trasmetterla agli animali domestici, contribuendo così al mantenimento dell'agente infettivo nell'ambiente (7). Gli animali sono spesso cronicamente infetti, ma quasi sempre asintomatici. Durante la fase acuta *C. burnetii* può essere ritrovata nel sangue, nei polmoni, nella milza e nel fegato. Nelle femmine bovine *C. burnetii* si localizza nell'utero e nelle ghiandole mammarie e può essere eliminata attraverso il latte, le feci e le urine. L'eliminazione del microrganismo attraverso queste vie può persistere per parecchi mesi, anche per i soggetti che non hanno presentato problemi al momento del parto (2).

La febbre Q è endemica nei ruminanti domestici nella maggior parte, se non tutti, i paesi europei (5). Anche nell'uomo l'infezione è presente in tutti gli stati membri dell'UE e, in alcune circostanze epidemiologiche, gli effetti sulla salute pubblica possono essere significativi. Sebbene l'infezione sia comune, la malattia è rara ed, essendo spesso asintomatica, non viene sempre diagnosticata. Di conseguenza i dati disponibili spesso sottostimano le dimensioni del fenomeno.

Al fine di verificare la presenza di *C. burnetii* negli allevamenti bovini e bufalini della regione Campania sono state condotte specifiche indagini su feti abortiti che possono essere ritenuti un'ottima fonte di preziose informazioni epidemiologiche a tal riguardo.

MATERIALI E METODI

Estrazione del DNA

69 feti abortiti di cui 17 bovini e 52 bufalini sono stati prelevati da

39 allevamenti campani nel triennio 2009-2011 e testati per la ricerca di *C. burnetii* mediante una single-tube nested PCR (9). Di ciascun feto risultato negativo alla detection di *Brucella* spp., *Chlamydia* spp., *Leptospira* spp., Bubaline Herpesvirus 1, *Neospora caninum*, *Arcanobacterium pyogenes* e *Toxoplasma* spp., sono stati prelevati differenti tessuti principalmente: polmone, fegato, abomaso e, quando disponibile, anche la placenta. Il DNA genomico totale è stato estratto dai tessuti congelati mediante l'utilizzo del QIAamp DNA mini kit (Qiagen) secondo le istruzioni riportate dal produttore. La concentrazione del DNA è stata determinata mediante assorbimento di raggi UV. I DNA sono stati conservati a -20°C prima di essere utilizzati come template per la reazione di amplificazione.

Single tube nested-PCR

La reazione di amplificazione è stata condotta secondo il protocollo proposto da Parisi et al. (9) che utilizzava 0.5 mM di ogni primer interno (261F e 463R) e 0.005 mM di ogni primer esterno (Trans1 e Trans2). 5 ml di DNA è stato usato in un volume finale di 50 ml utilizzando HotStartTaq Master Mix e soluzione Q (Qiagen) alla concentrazione finale di 1X. Gli amplificati della lunghezza attesa (203bp) sono stati visualizzati mediante elettroforesi automatizzata utilizzando il Qiaxcel (Qiagen).

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'indagine è stata condotta su un totale di 69 feti. Il DNA estratto da fegato, polmone, abomaso e dove è stato possibile placenta, è stato amplificato mediante una single-tube PCR nested per la detection di *C. burnetii*. I feti sono stati ritenuti positivi quando almeno uno degli organi campionati è risultato positivo.

I risultati ottenuti hanno mostrato che il 47% (8/17) dei feti bovini e il 29% (15/52) dei feti bufalini testati hanno dato esito positivo alla ricerca di *C. burnetii* (Tab. 1).

Tab.1 – Ricerca di *C. burnetii* in feti bovini e bufalini

Specie	Feti esaminati	PCR + (%)
Bovini	17	8 (47)
Bufalini	52	15 (29)
Totale	69	23 (33)

Degli 8 feti bovini positivi, il 50% (4/8) presentava *C. burnetii* nel polmone, il 12% (1/8) nel fegato e il 62% (5/8) nell'abomaso. In un solo feto il patogeno è stato rilevato sia nel polmone che nel fegato.

Specie	Feti PCR +	Polmone PCR + (%)	Fegato PCR + (%)	Abomaso PCR + (%)	Placenta PCR + (%)
Bovini	8	4 (50)	1 (12)	5 (62)	0
Bufalini	15	7 (47)	8 (53)	3 (20)	4 (27)
Totale	23	11 (48)	9 (39)	8 (35)	4 (17)

Dei 15 feti bufalini positivi, *C. burnetii* è stata rilevata nel fegato di 8 feti (53%), nel polmone di 7 feti (47%), nell'abomaso di 3 feti (20%) e nella placenta di 4 feti (27%). 4 feti avevano sia fegato che polmone *Coxiella*-positivi, uno solo presentava contemporaneamente positività in fegato, polmone e placenta, e un unico feto presentava fegato, polmone e abomaso positivi (Tab.2).

Gli aborti nelle aziende bovine e bufaline determinano gravi perdite economiche. In Italia meridionale l'incidenza degli aborti dovuti a malattie infettive è elevata e mancano tuttora dati organici che possano fornire una panoramica d'insieme sulle possibili cause di questo fenomeno (4). In particolare, tra gli agenti eziologici responsabili di aborto, sono ancora scarsi i dati relativi a *C. burnetii*, anche se quelli disponibili indicano che nel Sud della nostra penisola la presenza di questo patogeno è piuttosto significativa. Infatti, uno studio condotto in allevamenti bovini e ovi-caprini della Puglia e della Basilicata ha evidenziato valori di incidenza di *C. burnetii* dell'11.6% e 21.5%, rispettivamente (9), mentre, nella specie bufalina campana, sono stati riscontrati valori di prevalenza interaziendale variabili dal 17 al 23% (6, 10).

I dati riportati in questo studio confermano innanzitutto la presenza di *C. burnetii* sia negli allevamenti bovini che bufalini, e indicano che questo patogeno svolge un ruolo importante come agente abortigeno. In particolare, la specie bufalina sembra essere quella maggiormente interessata, e altri studi saranno pertanto necessari per chiarire l'epidemiologia e la patogenesi della febbre Q nel bufalo, anche in considerazione del fatto che tale specie difficilmente viene parassitata da zecche.

La single-tube nested PCR utilizzata per determinare la presenza di *C. burnetii* negli allevamenti bufalini e bovini sembra essere inoltre un metodo diagnostico particolarmente efficace. Questa tecnica, oltre alla sua elevata sensibilità, presenta il vantaggio di amplificare una regione più piccola dell'elemento d'inserzione IS111 grazie all'utilizzo di primers interni. In questo modo viene incrementata la possibilità di rilevare il DNA di *C. burnetii* in tessuti animali dove si assiste facilmente ad una degradazione del DNA per fenomeni di autolisi, come spesso accade nei feti animali.

In conclusione, sulla base dei dati riportati, appare fondamentale l'istituzione di specifici approfondimenti diagnostici e di opportuni piani di monitoraggio per l'attenta valutazione della prevalenza della patologia e delle vie di trasmissione di *C. burnetii*. Queste informazioni saranno utili per una corretta pianificazione delle attività di controllo e profilassi della febbre Q negli allevamenti campani.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- 1) Angelakis E, Raoult D (2010) - "Q Fever". Veterinary Microbiology, 140: 297-309.
- 2) Berri M, Rousset E, Hechard C, Champion JI, Dufour P, Russo P, Rodolakis A (2005) - "Progression of Q fever and *Coxiella burnetii* shedding in milk after an outbreak of enzootic abortion in a goat herd". Veterinary Records 156: 548-549.
- 3) Borriello G, Iovane G, Galiero G (2010) - "La febbre Q negli animali domestici". Large Animals Review 16: 273-283.
- 4) Capuano F, Parisi A, Cafiero M, Picaro L, Fenizia D (2004) - "*Coxiella burnetii*: what is the reality?". Parassitologia 46: 131-134.
- 5) EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW). (2010) - "Scientific opinion on Q fever". EFSA Journal 8: 1595-1708.
- 6) Galiero G, Goffredi Cg, D'orazi A (1996) - "Epidemiology of Q fever: seroprevalence in buffalo dairies of Salerno province". Selezione Veterinaria, 6: 407-412.
- 7) Kazar J (1996) - "Q fever". In: Rickettsiae and Rickettsial Diseases, Kazar, J., Toman, R. (Eds.), pp. 353-362, Slovak Academy of Sciences, Bratislava.
- 8) Maurin M, Raoult D (1999) - "Q fever". Clinical Microbiology Reviews 12: 518-553.
- 9) Parisi A, Fraccalvieri R, Cafiero M, Miccolupo A, Padalino I, Montagna C, Capuano F, Sottili R (2006) - "Diagnosis of *Coxiella burnetii*-related abortion in Italian domestic ruminants using single-tube nested PCR". Veterinari Microbiology 118: 101-106.
- 10) Perugini AG, Capuano F, Esposito A, Marianelli C, Martucciello A, Iovane G, Galiero G (2009) - "Detection of *Coxiella burnetii* in buffaloes aborted fetuses by IS111 DNA amplification: A preliminary report". Research in Veterinary Science 87: 189-191.

DETERMINAZIONE DEI PESTICIDI ORGANOCLORURATI MEDIANTE GC-ECD, PER INDAGINI TOSSICOLOGICHE IN CANI DELLA REGIONE SICILIA, ANNI 2009-2010.

Macaluso A.¹, Cicero A.², Giangrosso G.¹, Billone E.¹, Vella A.¹, Ferrantelli V.¹

¹Area Chimica e Tecnologie Alimentari Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri" Palermo;

²Università degli studi di Messina

Key words: organoclorurati, poisoning, GC-ECD

SUMMARY - The veterinarians are obliged to confer all the animals found suspected of poisoning. organochloride pesticides are utilized in agriculture to kill parasites and often dogs assume this toxic and die. This study shows the data recorded by the Chemistry Laboratory of the Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia in the period 2009-2010 using an GC/ECD.

INTRODUZIONE - Secondo il Federal Environment Pesticide Control dell'O.M.S. con il termine "pesticida" si intende "una sostanza o una miscela di sostanze atte a prevenire, distruggere, allontanare o attenuare qualsiasi avversità (insetto, nematode, fungo, erbe nocive ed altre forme di piante terrestri ed acquatiche) e qualsiasi sostanza o miscela di sostanze usate come influenzanti la vita delle piante, compresi i defolianti e gli essiccanti" (1). Tra i tanti pesticidi presenti in commercio particolare attenzione destano i pesticidi organoclorurati, ampiamente utilizzati a livello globale dal 1940 (DDT) per il loro forte effetto nel controllo dei parassiti e delle malattie (2). Sono composti molto persistenti e la loro persistenza nell'ambiente si misura in anni. A causa di questa loro persistenza e della grande capacità di accumulo negli organismi viventi (3), (4), l'uso della maggior parte dei composti OC è stato bandito. Gli organoclorurati sono composti organici a struttura chimica diversificata, caratterizzata dalla presenza di uno o più atomi di cloro, da elevata solubilità nei lipidi e da lenta degradabilità. Per la loro stessa natura possono risultare pericolosi per l'uomo o per gli altri animali, in quanto il loro scopo è di uccidere o danneggiare gli organismi viventi. Il rischio tossicologico per gli animali può essere legato sia alla natura dolosa (esche o bocconi avvelenati, il cui divieto di utilizzo e di detenzione è stato regolamentato con ordinanza ministeriale del 18 dicembre 2008) sia alla assunzione accidentale con l'acqua di bevanda o l'alimento oppure a un'esposizione occasionale, allorché l'animale sosta o transita su un terreno irrorato direttamente con il pesticida. L'intossicazione può avvenire per inalazione, per assunzione attraverso il tratto gastro-intestinale, per contatto con le mucose buccali, nasale, congiuntivale e con la cute. In base alla loro tossicità possono essere così classificati:

- Altamente tossici, DL50 animale, via os. < 50 mg/Kg di peso corporeo (Al drin, Dieldrin, Endosulfan, Endrin);

- Moderatamente tossici, DL50 animale, via os. >50 mg/Kg di peso corporeo (Clordane, DDT, Eptaclor, Depone, Gamma-BHC o Lindane);

- Debolmente tossici, DL50 animale, via os. >1000 mg/Kg di peso corporeo (HCB o Esaclorobenzene, Etilan, Metossicloro).

Gli organoclorurati sono stimolanti aspecifici del sistema nervoso centrale causando alterazione degli scambi ionici della membrana assonica con ritardo della chiusura dei canali del sodio e inibizione della fuoriuscita del potassio. Si verifica di conseguenza riduzione della soglia di eccitabilità del nervo potenziale di riposo più vicino al valore del potenziale soglia di eccitabilità, depolarizzazione protratta blocco del passaggio dell'impulso, intensa eccitazione/profonda depressione,

insufficienza e blocco respiratorio, aumentata concentrazione encefalica di radicali ammoniacali (sintomatologia convulsiva). Il quadro clinico nel cane è caratterizzato da: nausea, vomito, tremori, ottundimento, convulsioni, depressione respiratoria, sintomatologia prolungata a causa dell'alta liposolubilità.

Si possono avere aritmie, segni di lesione epatica, danno renale (glomerulo e tubulo). La morte sopravviene normalmente per paralisi dei muscoli respiratori.

Il presente contributo riporta i dati relativi alla ricerca dei pesticidi organoclorurati in cani deceduti e conferiti all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia nel biennio 2009 - 2010.

MATERIALI E METODI - Le analisi, condotte nei laboratori dell'Area di Chimica e Tecnologie Alimentari dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, erano rappresentati dallo stomaco e dal suo contenuto, dal fegato e dai reni di 203 carcasse di cani inviate dai Servizi Veterinari Ufficiali, da veterinari libero professionisti e dalle forze dell'ordine (Carabinieri, N.A.S., ecc). La metodica è utilizzata per la determinazione di Pesticidi organoclorurati (Metossicloro, Aldrin, trans-Clordano, 2,4-DDT e 4,4-DDT, 4,4-DDE, 2,4-DDD e 4,4-DDD, Dieldrin, α -Endosulfan, β -Endosulfan, Endosulfan solfato, Endrin, Eptaclor, Esaclorobenzene, α -HCH, β -HCH, γ -HCH) in matrici biologiche mediante estrazione in fase solida ed analisi gas-cromatografica con rivelatore a cattura di elettroni ECD utilizzando due colonne di polarità diversa su due diversi canali. La metodica utilizzata è la seguente: Pesare in un tubo da centrifuga in plastica, 5gr di campione opportunamente omogeneizzato, al quale si aggiungono 100 μ L di fenclorfos come Standard Interno (SI) 50 mg/L e 50 ml di Acetonitrile (Sigma Aldrich). Estrarre il campione in bagno ad ultrasuoni per circa 5 minuti a 30 °C, lasciarlo a riposo per qualche minuto e quindi filtrare l'estratto attraverso carta da filtro in un matraccio tarato da 100ml; lavare opportunamente il campione e la carta da filtro utilizzando più aliquote da 5 ml di acetonitrile. Portare successivamente a volume di 100ml nel matraccio. Preparare una colonnina SPE C18 1000mg/6ml con in testa circa 2 cm di solfato di sodio anidro e collegarla al manifold da vuoto. Condizionare la colonna facendo eluire con 6 ml di acetonitrile senza mandare a secco ma lasciando un leggero battente di solvente e scartando l'acetonitrile raccolto. Caricare la colonnina C18 con 2 ml dell'estratto precedentemente. Eluire con 15 ml di acetonitrile, raccogliendo l'eluato in un pallone con collo a smeriglio da 50ml. Portare l'eluato raccolto a piccolo volume con evaporatore rotante, riprendere il residuo, trasferire in vials da 10ml e portare a secco in corrente di azoto alla temperatura di 40°C. Riprendere l'estratto ottenuto con acetone e portare al volume di 1 ml. La soluzione così ottenuta (concentrazione finale 0,1 g/ml di campione, 100 μ g/L di SI) è pronta per l'analisi in GC-ECD. Il modello di gascromatografo utilizzato è Gascromatografo Perkin-Elmer Clarus 500 con detector ECD. Le condizioni sperimentali hanno previsto l'utilizzo di due colonne cromatografiche:

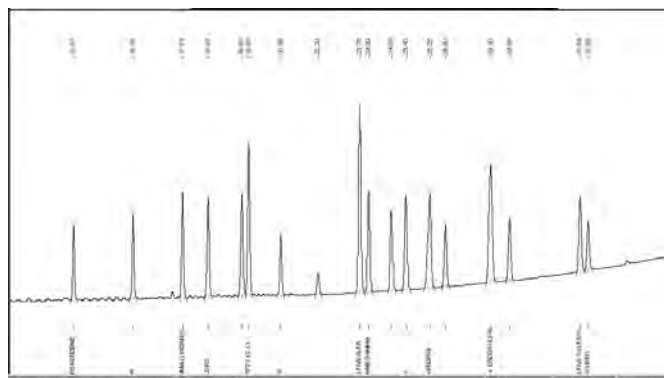
- Canale A: VF-1701 capillare 30 m x 0,25 mm ID, 0.25 µm film o equivalente;
- Canale B: VF-5 capillare 30 m x 0,25 mm ID, 0.25 µm film o equivalente;

con le condizioni operative di seguito riportate:

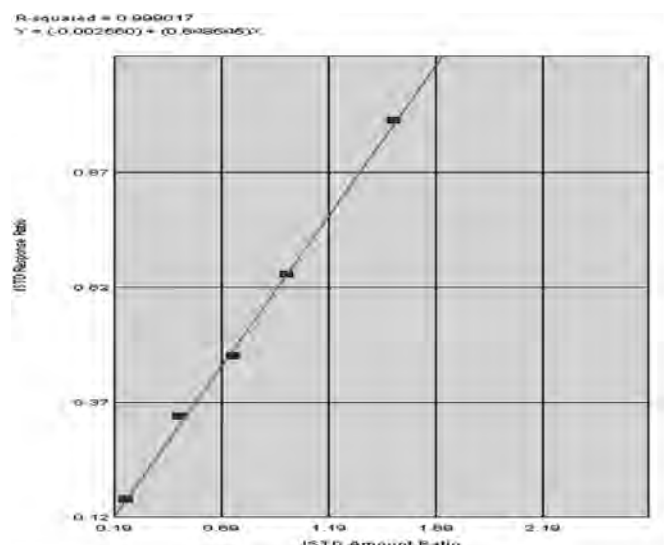
- Carrier Gas: Azoto 5.5, flusso in colonna 2,0 ml/min.;
- Temperatura iniettore: 250 °C;
- Modalità di iniezione: Split;
- Flusso di splittaggio: 20 ml/min;
- Volume di iniezione: 1 µL;
- Programma termico: 60 °C (isoterma per 0,5 minuti), rampa a 15 °C/min fino a 150 °C, rampa a 4 °C/min fino a 275 °C, rampa a 15 °C/min fino a 300 °C, (isoterma per 2 minuti).
- Temperatura degli ECD: 350 °C;
- Gas di Make-up: Azoto 5.5, flusso 30 ml/min;

Di seguito sono riportati un cromatogramma e una retta di taratura:

Cromatogramma

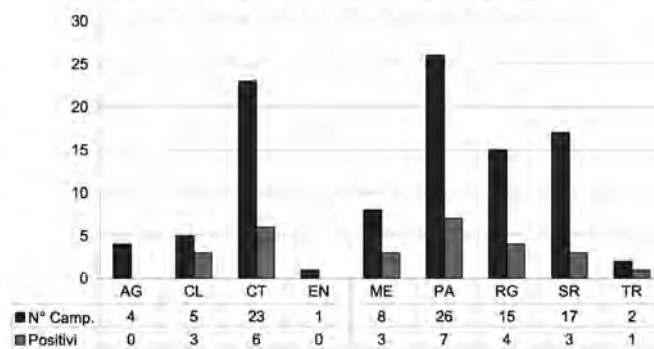


Retta di taratura

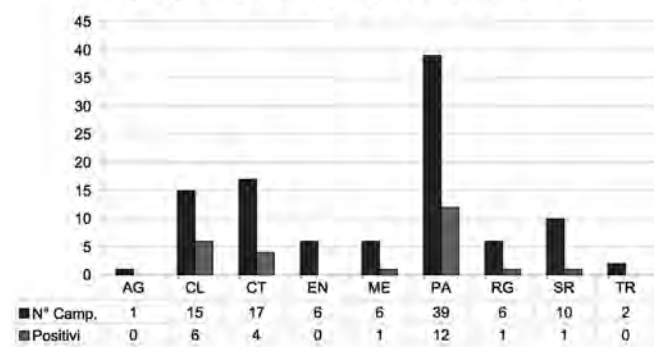


RISULTATI – Dei 203 soggetti analizzati sono state trovate concentrazioni di pesticidi organoclorurati tali da giustificare la morte in 52 carcasse. Nelle tabella successive vengono riportati nel dettaglio la distribuzione dei campioni per provincia per i rispettivi anni:

Campioni CANI per provincia - 2009



Campioni CANI per provincia - 2010



DISCUSSIONE - L'ordinanza ministeriale 18 dicembre 2008 (modificata dalla O.M. 19 marzo 2009) obbliga il medico veterinario all'invio delle carcasse di animali deceduti per sospetto avvelenamento all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale competente per territorio, corredate da anamnesi e ogni altro elemento utile all'identificazione del veleno o della sostanza causa del decesso. Ovviamente tutto ciò ha contribuito a una maggiore sensibilizzazione degli addetti ai lavori al "Problema avvelenamento", con conseguente incremento del numero di carcasse pervenute presso i nostri laboratori. Per quanto riguarda i pesticidi organoclorurati oggetto del nostro studio, possiamo dire che una percentuale del 25% è più che sufficiente a far sì che questi vengano considerati tra le sostanze di maggior impiego nell'avvelenamento degli animali da compagnia e in particolare dei cani.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Luppi A., Perillo A., 1998. Rilievi immunoistopatologici in due cani intossicati da methomyl. Annali della facoltà di Med. Vet. di Parma Vol. XVIII.;
- 2) Chen, S., Lili, S., Zhengjun, S., Qiuhui, H., 2007. Determination of organochlorine pesticide residues in rice and human and fish fat by simplified two-dimensional gas chromatography. Food Chemistry 104, 1315–1319;
- 3) Andersson, P.L., Berg, A.H., Bjerselius, R., Norrgren, L., Olsen, H., Olsson, P.-E., Orn, S., Tysklind, M., 2001. Bioaccumulation of selected PCBs in zebrafish, three-spined stickleback and Arctic char three different routes of exposure. Archives of Environment Contamination and Toxicology 40, 519–530.
- 4) Stefanelli, P., Muccio, A.D., Ferrara, F., Barbini, D.A., Generali, T., Pelosi, P., Amendola, G., Vanni, F., Muccio, S.D., Ausili, A., 2004. Estimation of intake of organochlorine pesticides and chlorobiphenyls through edible fishes from the Italian Adriatic Sea during 1997. Food Control 15, 27–38.

SU UN CASO DI INFESTAZIONE DA *PIOPHILA CASEI* IN UN FORMAGGIO DI LATTE DI PECORA PRODOTTO NEL LAZIO

Magliano A., De Liberato C., Flores Rodas E. M., Bogdanova T., Greco S., Del Frate S., Bilei S.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

KEYWORDS: food hygiene, *Piophilidae*, Pecorino

ABSTRACT

The present study describes a case of *Piophilidae* infestation in a cheese made with sheep milk and produced in a family run farm according to a traditional protocol.

INTRODUZIONE

Nel nostro paese esiste una tradizione casearia consolidata nel tempo nella produzione di pecorini che prevede l'infestazione naturale del prodotto da parte di *Piophilidae* finalizzata all'ottenimento attraverso la degradazione proteica, della trasformazione della pasta del formaggio in una crema piccante. Il più noto di questo tipo di formaggio è il Casu marzu, prodotto in Sardegna, il cui nome tradotto letteralmente significa "formaggio marcio", anche se viene più spesso ricordato come "formaggio con i vermi".

In realtà questo tipo di lavorazione non è conosciuto solamente in Sardegna ma anche in molte altre zone d'Italia. Alcune varietà difatti meno conosciute ma altrettanto speciali, sono: Formaggio du quagliu (Calabria), Formaggio Saltarello (Friuli Venezia Giulia), Pecorino marcetto o Cace fraceche (Abruzzo), Cacie'Punt o Cacio Punto (Molise).

Il metodo tradizionale di produzione di questi pecorini prevede genericamente le seguenti fasi:

- esposizione della forma di formaggio all'aria aperta perché la mosca casearia vi deponga le uova; la zona d'attacco e', di preferenza, nelle screpolature che si creano sulla crosta del formaggio; a volte si utilizzano alcuni accorgimenti per favorire la deposizione, es. riduzione dei tempi di salatura, formazione di piccoli buchi riempiti poi di olio con il duplice scopo di ammorbidire la crosta ed attirare la mosca;
- colonizzazione della forma da parte delle larve che si nutrono del formaggio; la presenza di uova e di larve, si evidenzia per la presenza di piccoli fori o crepe sulla superficie dovuti all'attività delle larve di 1° stadio;
- allontanamento delle forme ormai attaccate dalla mosca, per il completamento del processo produttivo.

Al termine del processo il pecorino all'interno si presenta con una pasta trasformata in una morbida crema omogenea di colore giallastro e dal sapore forte e piccante.

Le diverse tipologie di produzione prevedono infine diverse modalità di utilizzo del prodotto finale dal consumo diretto alla sua conservazione all'interno di recipienti di terracotta o di vetro.

Piophilidae (L.) Insecta: Diptera: *Piophilidae*, comunemente nota come "mosca del formaggio", è un dittero della famiglia *Piophilidae*, che si sviluppa su substrati ad alto contenuto proteico, arrecando alterazione nelle carni insaccate e in stagionatura, nel pesce affumicato e specialmente nei formaggi.

Gli adulti di *P. casei* sono lunghi 3-5 mm e presentano colorazioni metalliche scure, dal marrone al nero lucente, con occhi e zampe rossastre ed ali iridescenti. Le uova, cilindriche/

ovali, sono lisce e bianco-perlacee, misurano circa 0.63-0.74 mm di lunghezza e 0.18-0.2 di larghezza. Una femmina può deporre (su carni o formaggi) centinaia di uova (140-500), che schiudono tra le 23 e le 54 ore in un range di temperatura compreso tra 15° e 27°C. Le larve (6-8 mm di lunghezza), di forma allungata e colore biancastro, hanno la capacità di compiere salti di notevole lunghezza; utilizzano le spinte propulsive degli ultimi segmenti addominali ancorandosi con l'apparato boccale al substrato e rilasciando successivamente la presa; questo meccanismo è utilizzato anche per le "migrazioni larvali", quando le larve di solito abbandonano il substrato per impuparsi.

Uova, larve, pupe ed adulti si possono rinvenire sugli alimenti infestati o nelle immediate vicinanze di essi. Il ciclo vitale completo di *P. casei*, in adeguate condizioni di nutrimento e temperatura, si compie in circa 12 giorni (1 giorno per le uova, 5 per lo sviluppo dei 3 stadi larvali, 5 per quello delle pupe, 1 giorno per il nutrimento degli adulti prima della riproduzione). Come in tutti gli insetti, il tempo di sviluppo è influenzato dalla temperatura; da diversi studi è emerso che la specie è adattata ad un ampio range di regimi termici e ciò le conferisce la capacità di colonizzare ambienti differenti.

Le infestazioni nei locali di produzione e stagionatura avvengono nei mesi più caldi, quando l'aumento della temperatura esterna favorisce il ciclo vitale della mosca. La comparsa di *P. casei* si registra in genere intorno alla fine di maggio e si protrae sino alla fine di ottobre, periodo durante il quale possono completarsi fino a 6 cicli biologici.

Oltre all'importanza economica, questa specie ha rilevanza sanitaria come responsabile di miasmi intestinali accidentali nell'uomo, dovute a ingestione di larve da cibo contaminato, che possono provocare diarrea, nausea, vomito ed altri sintomi gastrointestinali.

Attualmente ai sensi dell'art. 5 lettera "d" della Legge n° 283 del 30/04/1962⁽³⁾ è vietata la detenzione e vendita di tutti i prodotti che si presentino «invasi da parassiti».

Per lo stesso motivo nell'edizione del libro del "Guinness dei Primati" del 2009 il Casu Marzu e' stato denominato come "il formaggio più pericoloso del mondo".

Tuttavia, al fine di salvaguardarne l'esistenza sulla base del art. 8 del Decreto Legislativo n° 173/98⁽⁴⁾ e del Decreto Ministeriale del 8 settembre 1999, n. 350⁽⁵⁾, alcuni di questi prodotti come il Casu Marzu e il Pecorino marcetto sono stati inseriti nell'Elenco Nazionale dei Prodotti agroalimentari tradizionali italiani del Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali e per quanto riguarda il formaggio sardo, è stato richiesto già nel 2004 all'Unione Europea il riconoscimento del marchio DOP.

E' stata pure ipotizzata la possibilità della produzione legale di questo prodotto con le adeguate garanzie igieniche, realizzando un allevamento di *P. casei* in ambiente sterile, per poter ottenere il pieno controllo sull'igiene dell'intero processo produttivo⁽²⁾. Ancora oggi la richiesta del marchio europeo e le iniziative correlate non hanno avuto seguito.

MATERIALI E METODI

Alla fine di giugno 2011 è stata richiesta un'indagine parassitologica su un campione di formaggio di latte di pecora sospetto di essere infestato da larve di insetti.

La forma di formaggio si presentava già tagliata e parzialmente consumata, con le superfici di taglio che consentivano di valutare la presenza di rare forme larvali all'interno di piccole occhiature della pasta.

Il formaggio risultava prodotto con latte crudo e con l'impiego di caglio naturale di agnello secondo un processo di tipo artigianale, presso un piccolo caseificio annesso ad un allevamento nella campagna romana. In questa azienda il pecorino viene prodotto con latte aziendale, mediante lavorazione manuale lungo tutto il processo di produzione. L'asciugatura e la maturazione avvengono in un unico locale di stagionatura attiguo a quello dove avviene la produzione casearia, privo di finestre e di ventilazione forzata e di controllo della temperatura.

Il formaggio già dopo una stagionatura di 20 - 30 giorni è esitato alla vendita diretta presso l'azienda.

Il campione di pecorino è stato sottoposto ad un immediato esame ispettivo ripetuto nei giorni successivi per raccogliere un numero maggiore di larve e per consentire il completamento di un primo ciclo biologico con lo sfarfallamento della mosca.

Successivamente è stato eseguito l'esame entomologico per la identificazione della specie.

RISULTATI

All'esame ispettivo soprattutto nei giorni successivi, il campione è risultato fortemente invaso da larve alcune delle quali presentavano :

- sulla crosta dove erano presenti contemporaneamente diversi stadi di sviluppo larvale e talune mosche adulte, probabilmente fuoriuscite attraverso crepe superficiali della lunghezza di 2 - 6 cm;
- sulla superficie di taglio dove numerose forme larvali vive risultavano evidenti nell'occhiatura;
- al cuore del prodotto dove la massa casearia era già in parte liquefatta, con evidenti numerosi grumi di consistenza pastosa ed alcune larve vive di color biancastro.

All'esame olfattivo si percepiva un caratteristico odore di pecorino stagionato.

Gli insetti adulti e le forme larvali raccolti sono stati sottoposti identificati come appartenenti alla specie *Piophilidae casei*.

DISCUSSIONE

Le infestazioni da insetti costituiscono uno dei principali rischi nelle produzioni casearie.

In particolare *P. casei* assume di frequente un'alta importanza economica a causa dei gravi danni alle industrie alimentari. Il suo controllo chimico in tali situazioni è difficile, sia per i residui che possono alterare e/o contaminare i prodotti, sia per la propensione del dittero a sviluppare fenomeni di resistenza agli insetticidi.

Affidabili piani di autocontrollo presso i caseifici indipendentemente dalle loro caratteristiche strutturali e produttive, associati ai controlli permanenti da parte del Servizio Veterinario, rappresentano un valido strumento di garanzia della qualità igienico-sanitaria del prodotto.

Nel caso specifico, il caseificio aziendale dal punto di vista strutturale appariva privo delle adeguate misure fisiche (es. zanzariere alle finestre) atte ad impedire l'entrata di eventuali artropodi e tuttavia i conduttori dell'azienda non mostravano alcuna conoscenza del rischio legato a questo tipo di infestazione, soprattutto nei riguardi della salute pubblica.

Nello stesso tempo, resta un fatto importante ed inequivocabile che *P. casei* è uno storico protagonista nella produzione di alcuni formaggi espressione di tradizioni tramandate nel tempo in diverse regioni d'Italia. Attualmente, in assenza di apposite regole che consentano di tutelare l'originalità del prodotto e di innovative tecnologie mirate ad assicurare un costante controllo sulla qualità igienica lungo il processo di lavorazione, tali formaggi sono "clandestini" e come tali sembrano destinati a rimanere con il rischio purtroppo di scomparire con il tempo.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Ozerov, 2000. Piophilidae. In: Papp, L. & Darvas, A. (eds). Contributions to a Manual of Palaearctic Diptera. Appendix Volume
- 2) Emanuele Dessì, 2005. Casu marzu, vermi col bollino. Il formaggio marcio in lizza per il marchio DOP - UnioneSarda, 9 agosto 2005, p. 10
- 3) Legge n. 283 del 30.04.1962 "Disciplina igienica della produzione e della vendita delle sostanze alimentari e delle bevande"
- 4) Decreto Legislativo 30 aprile 1998, n. 173 "Disposizioni in materia di contenimento dei costi di produzione e per il rafforzamento strutturale delle imprese agricole, a norma dell'articolo 55, commi 14 e 15, della legge 27 dicembre 1997, n. 449"
- 5) Decreto Ministeriale del 8 settembre 1999, n. 350 "Regolamento recante norme per l'individuazione dei prodotti tradizionali di cui all'articolo 8, comma 1, del decreto legislativo 30 aprile 1998, n. 173"

L'UTILIZZO DEI FERTILIZZANTI ORGANICI E LA PRESENZA DI SPICOLE OSSEE NEI TERRENI ADIBITI A COLTIVAZIONI AD USO ZOOTEKNICO: DATI PRELIMINARI

Marchis D., Prudente C., Benedetto A., Amato G., Poma Genin E., Millone A.*, Dutto D. *, Pellegrino M., Abete M. C.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino;
C.Re.A.A. – Centro di Referenza Nazionale per la Sorveglianza ed il Controllo degli Alimenti per Animali
Via Bologna, 148 – 10154 Torino
ASL CN 1

Key words: fertilizzanti organici, spicole ossee, suolo

INTRODUZIONE

Il Regolamento CE 163/2009 considera inevitabile la contaminazione del suolo da spicole ossee a causa dell'utilizzo dei fertilizzanti organici contenenti farine di carne e ossa. Nei paesi dell'Europa nord orientale sono comuni i rilevamenti di piccole contaminazioni di mangimi ma si hanno poche notizie riguardo il suolo italiano. Questa ricerca ha inoltre preso spunto dalle osservazioni effettuate nel corso dell'ispezione FVO DG SANCO avvenuta nel Maggio del 2010 e dal Reg CE 1069/2009 e il suo regolamento attuativo, il Reg UE 142/2011. Le restrizioni che prevedono l'osservanza del tempo di attesa di 21 giorni, limite entro cui gli animali d'allevamento hanno il divieto di pascolo presso questi terreni e non è possibile effettuare la raccolta del foraggio o dei cereali, erano peraltro già previste dal Regolamento (CE) 181/2006. I campionamenti del suolo sono stati effettuati dal Servizio Veterinario dell'ASL CN 1, nella Provincia di Cuneo. La programmazione dei campionamenti di suolo è stata studiata per verificare l'efficacia del rispetto del tempo di attesa riportato in legislazione e per verificare il livello di contaminazione del suolo da spicole ossee presso le aziende agricole che producono insilato e che utilizzano fertilizzanti organici. Le analisi sul suolo hanno richiesto la messa a punto di una metodica di laboratorio *ad hoc* utile all'estrazione delle PAT dal suolo.

MATERIALI E METODI

A ogni campione di suolo, prelevato da appezzamento coltivato a mais ad uso zootecnico, corrisponde una campione di insilato o di sfalcio. L'insilato è destinato all'alimentazione di bovine da latte, bovini da riproduzione e vitelli da carne.

I colleghi del Servizio Veterinario CN1 hanno effettuato i campionamenti in due diverse fasi: giugno-dicembre 2010 (tab. 1) e aprile -maggio 2011 (tab. 2).

Giugno-dicembre 2010: Sono stati esaminati 50 campioni, 25 di suolo e 25 di materie prime. I verbali di prelevamento segnalano l'utilizzo di fertilizzanti organici solo in cinque casi.

Le analisi sono state condotte seguendo due metodiche differenti analizzando il prodotto tal quale dopo macinazione e setacciatura e l'eventuale sedimento estratto con tetracloroetilene (TCE), poi raccolto, seccato in stufa ed osservato in microscopia ottica; secondo la metodica ufficiale (Reg. (CE) 152/2009, all. VI); per il suolo invece è stata messa a punto una metodica che prevede l'utilizzo di perossido di idrogeno (H_2O_2) per la digestione della materia vegetale.

Tutti i campioni sono inoltre stati sottoposti ad estrazione del DNA genomico, e successiva PCR Real Time, con target genetico nucleare specifico per ruminante: il trasposone SINE Bov-A2 (1)

Tabella 1-Campioni ASL Cn 1, periodo giugno-dicembre 2010

Matrice	N campioni analizzati	Esame eseguito
suolo	25	H_2O_2 / PCR
insilato	17	TCE /PCR
fieno	5	TCE /PCR
bucce di soia	3	n.e.

Aprile-maggio 2011: E' stata eseguita l'analisi di 3 campioni di suolo provenienti da un'azienda di bovini da carne, produttrice di mangimi per autoconsumo, che utilizza fertilizzanti organici. I prelievi sono stati eseguiti dalla stessa porzione di terreno a 3, 11 e 30 giorni di distanza dalla data di concimazione; contestualmente, è stato prelevato anche 1 campione del concime utilizzato per la fertilizzazione del suolo oggetto di campionamento, contenente il 4% di farina di carne ed ossa e il 4% di letame bovino essiccato.

Tabella 2-Campioni ASL Cn 1, periodo aprile-maggio 2011

Matrice	N campioni analizzati	Esame eseguito
suolo	3	H_2O_2 / PCR
concime	1	PCR

Tutti i campioni sono stati sottoposti ad estrazione del DNA genomico seguita da due analisi in PCR Real Time con Target ruminante e con Target pollo e tacchino. Su questi tre target è stata condotta un'analisi di tipo semi-quantitativo, attraverso la costruzione di una retta di calibrazione ottenuta usando quattro diluizioni seriali in base cinque del campione di concime al 4% di farina animale, e caricando i tre campioni di suolo (preparati con due diluizioni in base due per verificare eventuali episodi di inibizioni del DNA) con lo scopo di ottenere un risultato qualitativo e semi-quantitativo del DNA target presente nel suolo per interpolazione dalla curva standard costruita. È stato aggiunto un campione negativo e ogni campione è stato caricato in doppio.

RISULTATI

Campionamento maggio-dicembre 2010:

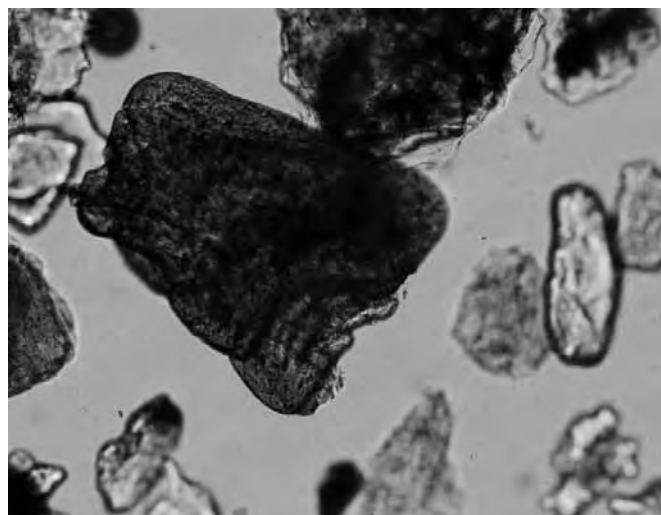
I risultati dell'analisi microscopica dei suoli trattati con H_2O_2 e dei fieni e insilati esaminati tal quali e trattati con TCE non hanno rivelato la presenza di costituenti di origine animale. La prova in PCR Real Time, per target ruminante, rivela la negatività dei suoli per il target in questione. La positività al target ruminante invece è evidente in 7 campioni di fieni e 2 di insilati.

Campionamento periodo aprile-maggio 2011:

L'analisi microscopica dei suoli condotta su vetrini permanenti colorati con rosso alizarina ha rivelato la presenza di frammenti

ossei nei suoli prelevati a 3, 11 e 30 giorni dall'applicazione del concime.

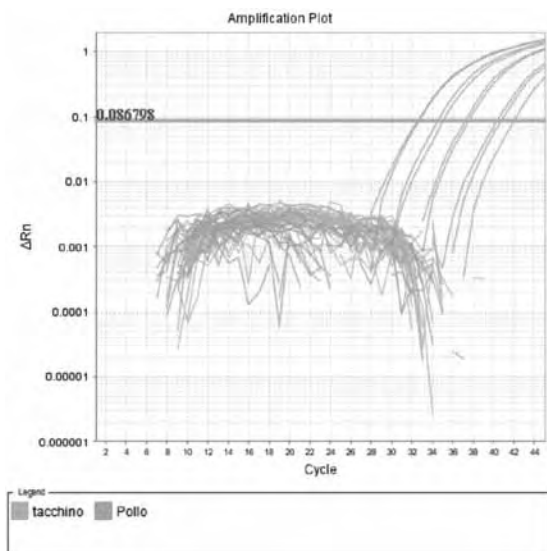
figura 1



Nel sedimento i frammenti ossei sono facilmente riconoscibili grazie alla caratteristica colorazione conferita dal rosso alizarina, rispetto al resto del sedimento che non mostra affinità verso il colorante (figura 1). Essi si presentano in bassissima concentrazione, in numero variabile da 1 a 4 per vetrino. Nel campione prelevato tre giorni dopo l'applicazione del concime, il numero di frammenti è maggiore nella frazione >250 µm, al contrario, negli altri campioni, i frammenti sono maggiormente presenti nella frazione <250 µm.

Prove in PCR: a livello qualitativo, la farina animale utilizzata come costituente organico del concime, mostra positività tanto per il target specifico per ruminante quanto, in misura minore, per il target specifico per pollo. La costruzione di una curva standard attraverso diluizioni seriali in base 5 del DNA estratto dal concime, avendo come target pollo e tacchino, ha prodotto il seguente plot di amplificazione (figura 2).

Figura 2 - Plot logaritmico di amplificazione: curva standard generata da diluizioni seriali in base 5 del DNA estratto dal concime, target pollo (in arancio) e tacchino (in azzurro).



DISCUSSIONE

I dati che ci sembrano di maggior rilevanza sono:

1) I fieni e gli insilati coltivati su terreni trattati con fertilizzanti organici hanno dato tutti esito negativo.

Questo risultato è in linea con quanto atteso, poiché, nonostante le segnalazioni provenienti da altri Paesi Europei e le sollecitazioni di DG SANCO, concretizzatesi durante la visita FVO del maggio 2010, tutta la rete degli IZZSS, nell'esecuzione dei campioni previsti dal PNAA non segnala presenza di spicole ossee nei mangimi. Si ricorda peraltro che l'Addendum PNAA 1/2010 del Ministero della Salute inserisce l'utilizzo dei fertilizzanti organici tra le priorità da utilizzare nella selezione dei luoghi in cui eseguire i prelievi di vigilanza a livello regionale.

2) I campioni eseguiti sul suolo a 3, 11 e 30 giorni dalla concimazione hanno confermato invece la presenza di frammenti ossei, seppur in quantità assai scarsa, confermando quindi la possibilità invece che campioni di materie prime o mangimi contenenti per esempio tuberi e radici, quindi residui di terreno, possano essere effettivamente contaminati da spicole ossee, come appunto segnalato in altri Paesi Europei. Il periodo di attesa di 21 giorni dopo la concimazione con fertilizzanti organici e ammendanti, così come previsto dal Regolamento CE 1069/2009, all'articolo 11 punto 1 lettera c, non sembra inoltre essere sufficiente per l'effettiva scomparsa di tracce di spicole ossee.

3) La presenza di DNA di pollo nel concime è da ritenersi in linea con quanto atteso, poiché i fertilizzanti organici sono costituiti da sottoprodotti appartenenti a differenti specie animali.

SUMMARY

Local Veterinary Services carried out the sampling of soils, silage / hay, according to the peculiar features of specific areas. A new method for extracting PAPs from soil was developed. No PAPs were detected from soil and from silage/hay. In soil collected 3, 11 and 30 days after fertilizing bone spicules were detected, despite of the 21 days waiting period to be respected before feeding farmed animals with herbage, either directly by grazing or by feeding with cut herbage, from land to which organic fertilizers, have been applied (Regulation EC 1069/2009).

BIBLIOGRAFIA

- 1) Mendoza-Romero L, Verkaar EL, Savelkoul PH, Catsburg A, Aarts HJ, Buntjer JB, Lenstra JA., *Real-time PCR detection of ruminant DNA*, J Food Prot. 2004 ;67(3):550-4,
- 2) Regolamento (CE) n. 152/2009,
- 3) Regolamento (CE) n. 163/2009,
- 4) Regolamento (CE) n. 1069/2009,
- 5) Regolamento (UE) n. 142/2011
- 6) Regolamento (CE) n.181/2006,

Questo lavoro è stato finanziato dal Ministero della Salute

AEDES ALBOPICTUS: SISTEMA DI SORVEGLIANZA ENTOMOLOGICA IN UMBRIA 2009-2010

Maresca C., Berretta C., Biasini G., Mangili P., Scoccia E., Tentellini M., Zingaretti G., Grelloni V.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

Key words: sorveglianza, *Aedes albopictus*, Umbria

SUMMARY

The first outbreak of autochthonously transmitted Chikungunya virus in Italy has shown the possibility to import arthropod-borne viruses in a temperate area. An ovitrap surveillance plan was carried out in Central Italy (Umbria Region) for two summer seasons to evaluate the distribution and the abundance of *Aedes albopictus*. This study indicated that *Aedes albopictus* will likely continue to spread and entomological surveillance is essential to prevent the spread of arboviruses and to evaluate the risk of the viral disease outbreak.

INTRODUZIONE

Il Piano regionale umbro per la prevenzione ed il controllo della "zanzara tigre" (*Aedes albopictus*) e la prevenzione della Chikungunya e della Dengue (Delibera della Regione Umbria n.1205 del 22 settembre 2008) è stato ideato in seguito al focolaio epidemico di febbre da Chikungunya verificatosi in Emilia Romagna nel 2007 (1,2). Questo primo focolaio autoctono, con oltre 300 casi riportati, verificatosi in Europa ha confermato l'ipotesi della possibilità di propagazione di malattie esotiche trasmesse da vettori in territori non endemici in cui è presente il vettore (3,4). I 2 focolai autoctoni e sporadici di Dengue verificatisi a Nizza, settembre 2010, avvalorano e confermano tale ipotesi (5,6).

Il piano, di durata biennale (2009-2010), si poneva due obiettivi principali:

- la prevenzione primaria e secondaria delle malattie Chikungunya e Dengue;
- la sorveglianza entomologica effettuata mediante azioni di sorveglianza e controllo del vettore dei virus.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di illustrare i risultati del piano di sorveglianza entomologica.

MATERIALI E METODI

Il monitoraggio è stato effettuato su tutto il territorio regionale tramite l'utilizzo di ovitrappe, poiché la numerosità delle uova deposte rappresenta un buon indicatore indiretto del grado di infestazione del vettore. Le ovitrappe sono state distribuite in vari comuni umbri, selezionati sulla base di parametri ambientali (altitudine), sociali (numero abitanti ed urbanizzazione), rappresentatività regionale e di valutazione del rischio. Ogni sito di posizionamento delle ovitrappe è stato georeferenziato e scelto in modo che presentasse l'habitat ideale per la zanzara tigre e al contempo fosse al sicuro da manomissioni volontarie ed involontarie, che ne pregiudicassero l'utilizzo da parte dell'insetto.

La raccolta settimanale dei campioni è stata effettuata da maggio ad ottobre nel 2009 e da maggio a novembre nel 2010. Sono stati individuati e calcolati due indicatori di presenza indiretta di zanzara tigre: TUC ed IO.

TUC= Tasso di Uova per Comune (MER= Municipality Eggs Rate) individua il numero di uova raccolte in rapporto alle settimane di cattura ed al numero di ovitrappe utilizzate. Questo indicatore standardizza il diverso numero di ovitrappe utilizzate e di settimane di cattura effettuate.

$$TUC = \frac{N. \text{uova comune}}{N. \text{settimane} * N. \text{ovitrappe}}$$

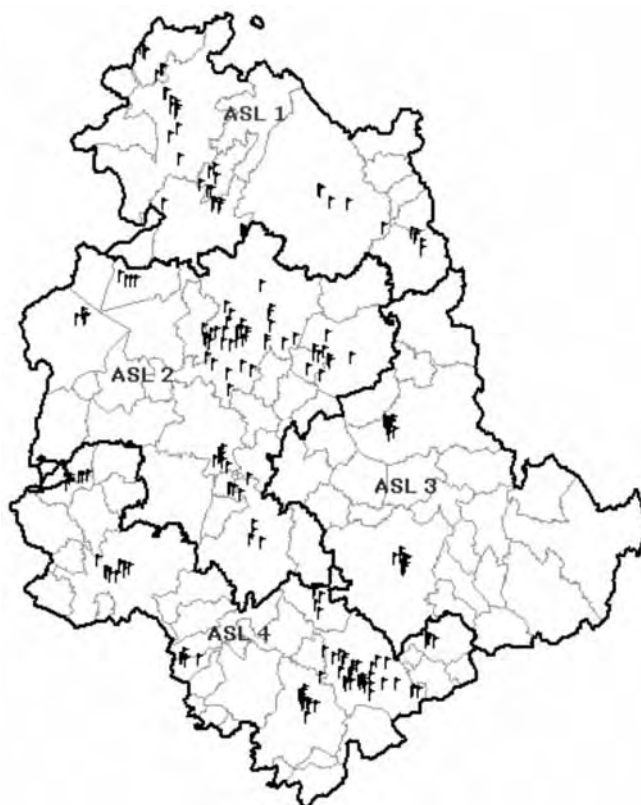
IO= Indice di Ovitrappe positive oppure OI (Ovitrap Index) indica il numero di ovitrappe positive rispetto al totale di ovitrappe esaminate.

$$IO = \frac{N. \text{ovitrappe positive}}{N. \text{ovitrappe esaminate}}$$

RISULTATI

Sono state attivate 206 ovitrappe nel 2009 e 211 ovitrappe nel 2010 in 24 comuni umbri durante la 21^a e la 45^a settimana solare (figura 1).

Figura 1: distribuzione ovitrappe nel territorio umbro



Il numero totale di uova rinvenute nei singoli anni diminuisce dal 2009 al 2010 (106.459 uova nel 2009 e 74.528 nel 2010), mentre la distribuzione spaziale aumenta. Nel 2010, infatti, vengono interessati i comuni di Gubbio e Gualdo Tadino nei quali nel 2009 non era stata rilevata nessuna attività di ovodeposizione da parte dell'insetto. Tra i 24 comuni soggetti

a monitoraggio solo in 9 di essi (Acquasparta, Alviano, Castiglione del Lago, Città di Castello, Fabri, Gualdo Tadino, Gubbio, Marsciano, Orvieto) si è avuto un aumento di uova rilevate nel 2010 rispetto al 2009 (figura 2).

Nel 2010 la distribuzione settimanale delle uova mostra, dei picchi simili rispetto all'anno precedente (29^a e 34^a settimana nel 2010, 30^a e 35^a nel 2009, corrispondente allo stesso periodo mensile; figura 3).

L'IO evidenzia una maggiore positività delle trappole nel 2009 rispetto al 2010 (50% vs 42%).

L'indicatore TUC, mostra tra i due anni uno spostamento verso valori estremi, aumentano cioè le aree comunali con un numero di uova massimo e minimo, pur scomparendo i comuni con zero uova.

Figura 2: numero uova raccolte per comune

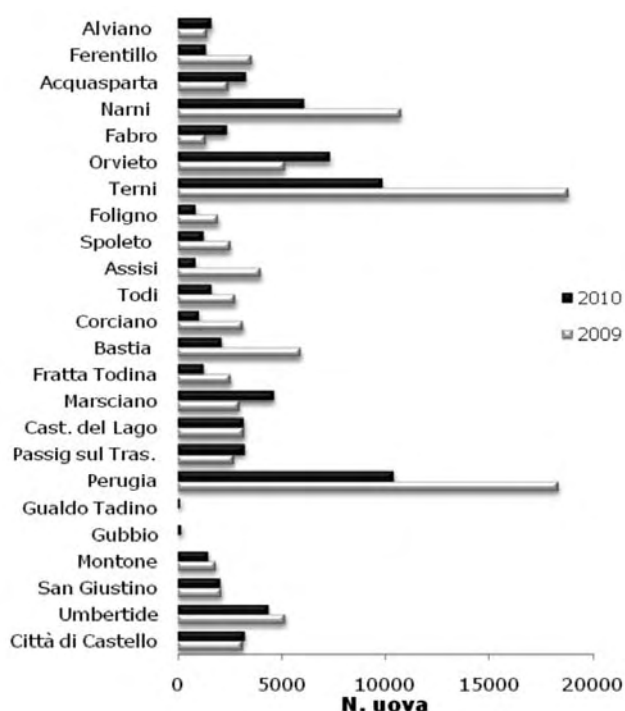
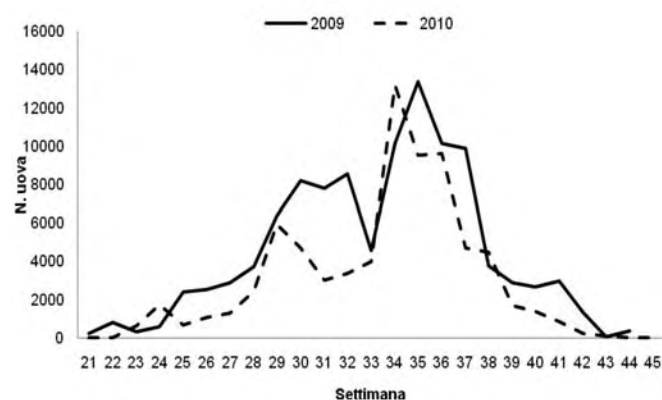


Figura 3: andamento settimanale delle uova raccolte per anno



DISCUSSIONE

Il piano ha permesso di evidenziare il grado di infestazione di *Aedes albopictus* in Umbria. I risultati hanno mostrato una variazione della presenza dell'insetto nel corso del tempo e, purtroppo, un aumento della colonizzazione spaziale anche in comuni inizialmente non inseriti nel monitoraggio (7).

Infatti i comuni di Gubbio e Gualdo Tadino monitorati a partire dal 2009 su richiesta delle autorità comunali, nonostante fossero situati ad una altitudine superiore ai 400 metri s.l.m., si sono positivizzati nell'anno successivo.

Il periodo in esame (maggio-novembre) si è rilevato essere quello ottimale e corrispondente al periodo di attività della zanzara in tutti i comuni esaminati.

La sorveglianza entomologica, si dimostra lo strumento più idoneo per valutare, in maniera costante ed aggiornata, la presenza di *Aedes albopictus* nel territorio.

BIBLIOGRAFIA

1. Angelini R, Finarelli AC, Angelini P, Po C, Petropulacos K, Macini P, Fiorentini C, Fortuna C, Venturi G, Romi R, Majori G, Nicoletti L, Rezza G, Cassone A, 2007. An outbreak of chikungunya fever in the province of Ravenna, Italy. *Euro Surveill*;12(9):E070906.1. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ew/2007/070906.asp#1>
2. G Rezza, L Nicoletti, R Angelini, R Romi, A C Finarelli, M Panning, P Cordioli, C Fortuna, S Boros, F Magurano, G Silvi, P Angelini, M Dottori, M G Ciufolini, G C Majori, A Cassone, 2007 Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet* 370, (9602): 1840-1846
3. Jelinek T. 2009. Trends in the epidemiology of dengue fever and their relevance for importation to Europe. *Euro Surveill*;14(25). pii: 19250. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19250>
4. Seyler T, Grandesso F, Le Strat Y, Tarantola A, Depoortere E. Assessing the risk of importing dengue and chikungunya viruses to the European Union. *Epidemics* 2009;1(3):175-184.
5. World Health Organization (WHO). Impact of dengue. Geneva: WHO. [Accessed 27 Sep 2010]. Available from: <http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/index.html>
6. Lambrechts L, Scott TW, Gubler DJ. 2010. Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. *PLoS Negl Trop Dis*;4(5):e646.
7. Maresca C., Scoccia E., Allegra D., Berretta C., D'Avino N., Di Giulio A., Iaconisi D., Magionami C., Mangili P., Pazzaglia L., Spennanzoni G., Zingaretti G., Grelloni V. 2010. *Aedes albopictus*: first year of surveillance in Umbria region (Central Italy). *Parassitologia* XXVI 52 (1-2):175.

ISOLAMENTO DAL LATTE BUFALINO DI BATTERI LATTICI CON POTENZIALE ATTIVITA' ANTIMICROBICA NEI CONFRONTI DI PATOGENI MASTITICI

Marianelli C.¹, Martucciello A.², Campanile G.³, Armas F.¹, Pasquali P.¹, De Carlo E.²

¹Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici

³Università degli Studi di Napoli Federico II, Facoltà di Medicina Veterinaria, DISCIZIA, Napoli

Key words: bufalo, mastite, batteri lattici

SUMMARY

Mastitis represents the main disease in buffaloes herds, affecting the animal health and both the quantity and the quality of milk production. Although antibiotics are effective against most mastitis pathogens, the development of alternative antimicrobial agents are encouraged in an age of mounting antibiotic resistance. In this study, lactic acid bacteria isolated from buffaloes milk were tested for antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*, by using the modified sandwich overlay method. Several isolates showed strong activity against mastitis pathogens.

INTRODUZIONE

L'allevamento del bufalo mediterraneo (*Bubalus bubalis*) in Italia ha assunto negli ultimi anni un'importanza zootecnica ed economica estremamente rilevante soprattutto nel Sud Italia. Oggi la specie bufalina allevata è da considerarsi una specie da latte. Con lo sviluppo e l'intensificazione dell'allevamento bufalino dal punto di vista zootecnico, si è assistito alla comparsa di numerose patologie, comuni con la specie bovina, che finora erano poco diffuse nel bufalo. Tra queste, di grande rilevanza è la mastite.

La mastite è una infiammazione che colpisce uno o più quarti della mammella ed è considerata la più comune malattia nelle aziende produttrici di latte. La malattia comporta una grave perdita economica per l'azienda, non soltanto dovuta agli alti costi per i trattamenti terapeutici ma soprattutto per la diminuzione della qualità igienico-sanitaria del latte che influenza, di conseguenza, la redditività dell'azienda. E' noto infatti che la mastite provoca profonde variazioni del carattere chimico, biochimico, fisico ed enzimatico del latte con gravi ripercussioni nella successiva fase di lavorazione del prodotto. Le modificazioni della composizione di vitamine, acidi grassi, enzimi e sali minerali ne alterano, inoltre, le caratteristiche organolettiche.

La causa più frequente di mastite è l'ingresso, esclusivamente per via ascendente attraverso il canale del capezzolo, di microrganismi all'interno della mammella con successiva loro proliferazione. Tali microrganismi vengono di norma classificati in contagiosi, come *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus*, ed ambientali, come coliformi e streptococchi diversi da *S. agalactiae*. Il controllo della mastite è principalmente basato sulla prevenzione e sul trattamento con terapie sistemiche o locali. La terapia antibiotica è quella generalmente seguita. Sebbene risulti molto efficace, presenta numerosi svantaggi tra cui l'elevato costo dei trattamenti, la comparsa di residui nel latte degli animali trattati, e la trasmissione dell'antibiotico resistenza sia al microbiota indigeno che ai potenziali patogeni. Di recente sono stati proposti nuovi trattamenti terapeutici, alternativi all'uso degli antibiotici per contrastare la crescita dei principali agenti patogeni mastitici. I più studiati riguardano l'uso di batteriocine, piccoli peptidi polipetici prodotti dai batteri Gram-positivi produttori di acido lattico, noti come batteri

lattici (*lactic acid bacteria*, LAB). In letteratura è ampiamente documentata l'elevata attività antimicrobica delle batteriocine sia *in vitro* (1, 2, 9) che *in vivo* nel modello murino (4). Promettenti risultati sono stati ottenuti anche in studi *in vivo* in bovini in lattazione: l'immersione delle mammelle (5) o l'infusione intramammaria con batteriocine (3, 8, 10) riduceva significativamente i patogeni mastitici nel canale mammario. Non risultano ad oggi studi sulla specie bufalina.

Scopo di questo lavoro preliminare è quello di studiare il microbiota autoctono della mammella di bufale sane e di selezionare *in vitro* quei LAB indigeni in grado di esprimere una potenziale attività antimicrobica nei confronti dei principali agenti mastitici isolati nell'allevamento bufalino: lo *S. aureus* e lo *S. agalactiae*. Successivamente saranno valutati *in vitro* la produzione di batteriocine e/o altre molecole, responsabili delle proprietà antimicrobiche degli isolati.

MATERIALI E METODI

Patogeni mastitici

Due patogeni isolati da bufale affette da mastite clinica e caratterizzati sia biochimicamente che molecularmente come *S. aureus* e *S. agalactiae*, sono stati utilizzati per i saggi *in vitro* dell'attività antimicrobica. I due patogeni sono stati cresciuti in brodo LAPT (1,5% peptone, 1% triptone, 1% glucosio, 1% estratto di lievito e 0,1 % tween 80) per 24 ore a 37 °C. Le UFC sono state successivamente contate in terreno LAPT agarizzato dopo opportune diluizioni delle colture.

Isolamento dei LAB dal latte bufalino

Il colostro di una bufala sana è stato raccolto poco dopo il parto in contenitori sterili e congelato a -20 °C fino al momento dell'analisi. Opportune diluizioni di latte sono state effettuate in acqua peptonata e piastrate in terreno MRS (De Man Rogosa Sharpe) agarizzato. Le piastre sono state successivamente incubate per 48 ore a 37 °C in atmosfera controllata con il 5% di CO₂ per l'isolamento dei LAB.

Saggio di attività antimicrobica

Le colonie isolate sono state saggiate per la loro attività antimicrobica nei confronti dei due patogeni mastitici mediante il metodo del *sandwich*, descritto precedentemente da Rodriguez e colleghi (6) e leggermente modificato. Brevemente, dopo 48 ore di incubazione, le colonie isolate sulle piastre MRS sono state ricoperte con 7 ml di brodo LAPT agarizzato mantenuto a 45°C ed inoculato con 0,7 ml di coltura o/n (circa 10⁷-10⁸ UFC/ml) di *S. aureus* o *S. agalactiae*. Dopo una incubazione di 24 ore a 37 °C, le colonie sono state osservate, classificate in base alla grandezza dell'alone di inibizione, piccate, stemperate in terreno MRS fresco, ed incubate per 24 ore a 37 °C in atmosfera controllata con il 5% di CO₂ per la successiva identificazione e caratterizzazione.

RISULTATI

I due campioni di colostro analizzati, presentavano rispettivamente una concentrazione di LAB pari a circa 7x10⁴

e 3×10^3 UFC/ml. Più di 400 colonie di batteri lattici sono stati isolati dai due campioni di latte. Di queste colonie, 48 sono state scrinate per la loro attività antimicrobica nei confronti dello *S. aureus* e 21 nei confronti dello *S. agalactiae*. L'alone di inibizione è stato misurato e le colonie sono state classificate in 4 gruppi: assenza di inibizione, inibizione debole (alone di circa 2 mm di diametro), inibizione media (alone compreso tra i 2 ed i 5 mm di diametro) ed inibizione forte (alone superiore ai 5 mm di diametro). I risultati sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1.

Inibizione	assente	debole	media	forte	N° totale colonie
vs. <i>S. aureus</i>	0	6	25	17	48
vs. <i>S. agalactiae</i>	10	0	7	4	21

Le colonie isolate hanno mostrato una maggiore attività antimicrobica nei confronti del patogeno *S. aureus*: sono state isolate infatti un numero maggiore di colonie con forte inibizione e non sono stati osservate colonie prive di attività.

I LAB con le più ampie zone di inibizione sono stati selezionati e processati per la loro tipizzazione. La loro identificazione e caratterizzazione mediante tecniche molecolari (amplificazione, sequenziamento ed analisi di una porzione del rRNA 16S) e mediante saggi biochimici (API 50 CH), è attualmente in corso nei nostri laboratori.

DISCUSSIONE

I batteri lattici o LAB sono microrganismi ampiamente diffusi in natura ed associati con vari prodotti alimentari come latte, carne e vegetali. Molte specie fanno parte della normale microflora della bocca, dell'intestino, della vagina e della ghiandola mammaria dell'uomo e degli animali in genere. Sono di forma bastoncellare o coccosa, capaci di fermentare gli zuccheri con produzione di acido lattico come principale prodotto. Al gruppo dei batteri lattici attualmente sono ascrivibili moltissimi generi, a cui appartengono le specie ed i ceppi maggiormente utilizzati nelle fermentazioni alimentari e/o come microrganismi probiotici, come i generi *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* ed *Enterococcus*. Le attività metaboliche di principale interesse alimentare sono legate alla fermentazione dei carboidrati, all'azione sulle proteine, alla produzione di sostanze aromatiche e alla produzione di sostanze ad azione antimicrobica. I LAB, infatti, sono in grado di produrre e rilasciare, oltre alle batteriocine, numerose altre sostanze ad azione antimicrobica come acidi organici (per es. acido lattico ed acido acetico), perossido di idrogeno, acidi grassi ed amminoacidi (7). Per questa loro attività antimicrobica, i LAB sono stati di recente utilizzati per contrastare la crescita dei patogeni mastici. Allo stato attuale non esistono dati sulla popolazione dei LAB nella specie bufalina, né tanto meno dati sul loro utilizzo come mezzo di prevenzione e lotta alle patologie ricorrenti in allevamento.

I nostri risultati preliminari indicano la presenza nel latte bufalino

di una popolazione di batteri lattici dotati di una notevole attività antimicrobica riscontrata soprattutto a carico dello *S. aureus*. La metodica di screening utilizzata ha permesso di isolare, partendo dalla stessa popolazione di batteri lattici, 21 ceppi con forte attività antimicrobica nei confronti dei due patogeni. Obiettivo successivo sarà lo screening di un numero maggiore di batteri lattici con potenziale attività antimicrobica, la loro identificazione e la caratterizzazione della loro attività attraverso la produzione e secrezione di eventuali batteriocine o di altre molecole attive.

Il presente contributo pertanto promuove la sperimentazione dei LAB autoctoni *in vivo* nei bufali, come alternativa ai farmaci normalmente utilizzati per il trattamento della mastite. Ciò permetterebbe di sviluppare protocolli terapeutici e/o profilattici in alternativa all'uso di antibiotici con riduzione, quindi, della presenza di residui nel latte destinato al consumo umano.

BIBLIOGRAFIA

1. Barboza-Corona JE, de la Fuente-Salcido N, Alva-Murillo N, Ochoa-Zarzosa A, Lopez-Meza JE. 2009. Activity of bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis* against *Staphylococcus aureus* isolates associated to bovine mastitis. *Vet Microbiol* 138: 179-183.
2. Brito MA, Somkuti GA, Renye JA Jr. 2011. Production of antilisterial bacteriocins by staphylococci isolated from bovine milk. *J Dairy Sci* 94: 1194-1200.
3. Cao LT, Wu JQ, Xie F, Hu SH, Mo Y. 2007. Efficacy of nisin in treatment of clinical mastitis in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 90: 3980-3985.
4. Kim SY, Shin S, Koo HC, Youn JH, Paik HD, Park YH. 2010. In vitro antimicrobial effect and in vivo preventive and therapeutic effects of partially purified lantibiotic lactacin NK34 against infection by *Staphylococcus* species isolated from bovine mastitis. *J Dairy Sci* 93: 3610-3615.
5. Klostermann K, Crispie F, Flynn J, Meaney WJ, Paul Ross R, Hill C. 2010. Efficacy of a teat dip containing the bacteriocin lactacin 3147 to eliminate Gram-positive pathogens associated with bovine mastitis. *J Dairy Res* 77: 231-238.
6. Rodriguez E, Gonzalez B, Gaya P, Nunez M, Medina M. 2000. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *Intern Dairy J* 10: 7-15.
7. Servin, A.L.. 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev* 28: 405-440.
8. Twomey DP, Wheelock AI, Flynn J, Meaney WJ, Hill C, Ross RP. 2000. Protection against *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows using a bismuth-based teat seal containing the bacteriocin, lactacin 3147. *J Dairy Sci* 83: 1981-1988.
9. Varella Coelho ML, Santos Nascimento JD, Fagundes PC, Madureira DJ, Oliveira SS, Vasconcelos de Paiva Brito MA, Freire Bastos Mdo C. 2007. Activity of staphylococcal bacteriocins against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* involved in bovine mastitis. *Res Microbiol* 158: 625-630.
10. Wu J, Hu S, Cao L. 2007. Therapeutic effect of nisin Z on subclinical mastitis in lactating cows. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 3131-3135.

PRODUZIONE ED USO DI UN VACCINO STABULOGENO PER LA PROFILASSI DELLE MASTITI OVINE DA *STREPTOCOCCUS SUIIS*

¹Marogna G., ²Bacciu D., ³Salis F., ¹Barbato A., ¹Fiori A., ²Uzzau S., ¹Schianchi G.

¹Dipartimento di Produzioni dell'Istituto Zooprofilattico sperimentale della Sardegna "G. Pegreffi";

²Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università di Sassari; ³Veterinario della Mangimi Martini SpA.

Key words: immunizzazione, innocuità, efficacia.

Abstract

In this work we report the set up and the experimental employment of an inactivated vaccines train of *Streptococcus suis*, in order to immunize a flock with a record of mastitis. Vaccines against *Streptococcus suis* mastitis in small ruminants have been never evaluated. The vaccine candidate was shown to be safe in immunised individuals. Immunogenicity and protectivity is still under evaluation.

Introduzione

Il Dipartimento di Produzioni dell'Istituto Zooprofilattico della Sardegna ha una antica tradizione e una consolidata esperienza nella produzione di vaccini stabulogeni contro gli agenti batterici responsabili di mastiti nei piccoli ruminanti. Negli ultimi anni sono aumentate le richieste di vaccini per diverse specie di batteri ambientali ed opportunisti appartenenti ai generi: *Staphylococcus*, *Streptococcus* ed *Enterococcus*. A seguito di queste nuove esigenze abbiamo sperimentato l'utilizzo di diverse nuove formulazioni, alcuni risultati sono già stati pubblicati (1-2), altri lavori sono in corso d'opera. Recentemente ci è capitato di verificare, su un gregge di ovini allevato nella Sardegna centrale, un importante focolaio di mastite provocata da *Streptococcus suis*. Come già capitato in altre circostanze, la nostra assistenza è stata richiesta dal veterinario di campo dopo constatazione dell'inefficacia delle normali vaccinazioni antimastitiche e delle diverse terapie antibiotiche provate. E' in questo contesto che abbiamo operato e deciso di allestire il vaccino stabulogeno sperimentale oggetto di questo lavoro.

Materiali e Metodi

- Composizione gregge al momento del nostro primo ingresso in allevamento: 500 adulte in mungitura, 50 adulte in asciutta, 165 giovani non partorite, 250 di rimonta.
- La visita clinica è stata effettuata su 96 capi adulti in mungitura selezionati random; sulla base dei riscontri clinici abbiamo selezionato 20 capi per i prelievi di latte.
- Il prelievo di latte veniva eseguito seguendo quanto descritto da Marogna et al. nel 2010 (3), in questa sede riteniamo importante ricordare che il campione di latte è unico per animale e viene costituito da una miscela del secreto delle due emimammelle.
- L'esame culturale prevedeva l'inoculo di 10 ml di latte in piastre di agar-sangue di montone al 5%, incubate a 37 ± 1 °C per 24-48h. Sulle piastre positive alla crescita, si procedeva all'isolamento di una colonia per le identificazioni di tipo fenotipico. Quando su uno stesso campione cresceva più di un genere, questo veniva catalogato come "flora microbica varia" e non si procedeva alle identificazioni di specie. Queste comprendevano la colorazione di Gram, i test della coagulasi e della catalasi. Queste indagini servono principalmente per discriminare fra i due gruppi normalmente chiamati in causa nelle mastiti batteriche delle pecore: gli stafilococchi e gli streptococchi. Le colture sono state quindi esaminate per la presenza di colonie attribuibili al genere *Staphylococcus* (catalasi positivi e Gram-positivi caratterizzati dalla disposizione in "cluster" delle cellule)

o *Streptococcus* e *Enterococcus* (catalasi negativi e Gram-positivi). A questo punto non si è proceduto all'identificazione tramite test biochimici multipli ma si è passati all'estrazione del DNA e alla identificazione con PCR.

- PCR - il DNA è stato estratto da ciascun ceppo attraverso la metodica della bollitura (boiling-prep). A tale scopo alcune colonie di ciascun ceppo sono state stemperate in 100 µl di H₂O milliQ sterile ed incubate a 100°C per 10 minuti. Dopo centrifugazione in una microcentrifuga a 12000 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente, il surnatante, contenente il DNA è stato trasferito in un tubino sterile ed utilizzato per le reazioni di PCR. Si è proceduto all'allestimento di PCR per l'identificazione di *Streptococcus suis* basata sull'utilizzo di primers specie-specifici che permettono l'amplificazione di una porzione di DNA specifica per ogni singola specie batterica. I primers sono stati disegnati sulla sequenza delle regioni variabili del DNA ribosomale (rDNA) 23S dell'operone dell'RNA ribosomale (rRNA) che è costituito da un alternarsi di regioni costanti e regioni variabili. I primers per *S. suis* erano già descritti in letteratura. La tabella 1 di seguito riportata mostra i primers utilizzati per la singola specie e le dimensioni degli ampliconi.

Il DNA batterico è stato amplificato in un volume finale di 25 µl, contenente 10mM Tris HCl pH 8.8, 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl, 0.1% triton X-100, 200 µM di ciascun desossiribonucleotide, 0.5 unità di DyNzyme DNA Polymerase (FINNZYMES) e 0.075 µM di ciascun primer. La reazione è stata effettuata utilizzando 3µl di DNA. La miscela di reazione è stata sottoposta al seguente ciclo termico di amplificazione genica: 5' a 94°C, seguiti da 30 cicli di 1' a 94°C, 1' a 56°C, 1' a 72°C, ed una estensione finale di 10' a 72°C. I prodotti di PCR sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1.5% in TAE Buffer e visualizzati con bromuro d'etidio su un trans-illuminatore a raggi UV. Come standard di peso molecolare è stato usato 1Kb DNA ladder (Gibco).

- Allestimento vaccino stabulogeno - alla fine di questa fase, le colonie di *Streptococcus suis* cresciute nelle piastre, potevano essere clonate e amplificate per la preparazione del vaccino vero e proprio. Una prima amplificazione consisteva nello stemperare in una provetta di Nutrient Broth (Oxoid) una singola colonia di streptococco tipizzato ed quindi incubarlo a 37°C per 24 ore; quindi si procedeva con un'ulteriore amplificazione eseguendo una nuova semina su un numero di unità di terreno di crescita proporzionale alla quantità di antigene necessaria alla preparazione delle dosi di vaccino da inoculare agli animali; questa seconda amplificazione avveniva seminando la sospensione madre in 5 litri di Trypticase soy broth (Oxoid), ed incubando per 24 h a 37°C. Il controllo della purezza della sospensione veniva effettuato eseguendo direttamente uno striscio su vetrino con colorazione di Gram e quindi una nuova semina in piastra di agar-sangue con incubazione a 37 °C per 36-48 ore, con conseguente nuovo striscio e colorazione di Gram. La brodo-cultura veniva quindi centrifugata a 6.000 g/min in centrifuga Sorvall refrigerata e il pellet dei batteri raccolto in soluzione fisiologica fino ad ottenere la una concentrazione di

streptococchi (109 UFC/ml). A questo volume di sospensione, si aggiungeva come adiuvante una quantità di idrossido di alluminio sufficiente ad ottenere una concentrazione finale al 10%, e quindi, si lasciava la soluzione in agitazione per circa 2 ore. L'inattivazione degli streptococchi veniva attuata aggiungendo alla sospensione della formaldeide al 40% (Carlo Erba) per raggiungere una concentrazione finale del 0.05%, così come previsto dalle linee guida per la preparazione dei vaccini stabulogeni che uniformano le metodiche di produzione fra i diversi Istituti Zooprofilattici. L'intero volume della sospensione così ottenuta veniva incubato a 37°C, in agitazione, per 24 ore e quindi inlaconato in bottiglie sterili da 250 ml.

- I controlli sul prodotto finito sono stati distinti in fisico-chimici (aspetto e pH), microbiologici (controlli di sterilità) e biologici (controlli di tossicità su topino). Per quanto concerne i controlli di sterilità, le prove hanno comportato la semina contemporanea di una aliquota della sospensione su diversi terreni di crescita:

- 1) agar sangue per verificare una eventuale crescita di batteri aerobi;

- 2) Sabouroud (Oxoid, U.K.) per verificare la crescita delle muffe;

- 3) Thioglicolate Broth (Oxoid) per verificare la crescita degli anaerobi;

- 4) Hayflick agar per verificare l'eventuale crescita di micoplasmi;

Il controllo della tossicità ha previsto l'inoculazione sottocutanea su topino di 1 ml di vaccino e quindi l'osservazione per 24 ore.

- Modalità di vaccinazione - il vaccino è stato inoculato su tutto l'effettivo del gregge. La dose di inoculo è stata di 2 ml per capo, somministrata sottocute. Il periodo utilizzato per la prima inoculazione è stato in prossimità dell'asciutta (luglio 2011). Il primo richiamo è stato somministrato a 30 giorni di distanza. Abbiamo poi previsto, in accordo con allevatori e veterinario aziendale, di richiamare la vaccinazione in prossimità dei parti, quindi attorno al mese di ottobre (2011) nelle pecore adulte e di febbraio (2012) nelle primipare. In generale tutti i vaccini stabulogeni vengono richiamati ogni 5-6 mesi.

RISULTATI

- Controlli fisico-chimici: la sospensione non ha evidenziato formazione di grumi o comunque di alterazioni particolari dell'aspetto, il valore finale di pH è stato 6.3

- Controlli microbiologici: nei controlli di purezza con agar sangue si è re-isolato esclusivamente lo *Streptococcus suis*.

- Controllo della sterilità: non è stata evidenziata alcuna crescita. Analogamente, nella semina degli altri terreni colturali (Sabouroud, Thioglicolate e Hayflick) non è stata mai evidenziata crescita.

- Controlli di tossicità: l'inoculazione di 1 ml della sospensione finale nel topino non ha evidenziato effetti di tossicità.

- Controlli sul campo: non si sono evidenziate reazioni nel punto di inoculo e, nelle 24 ore successive all'inoculazione, i soggetti vaccinati non hanno manifestato segni clinici comunque riferibili alla vaccinazione.

DISCUSSIONE

In bibliografia non abbiamo trovato traccia di vaccinazioni per la profilassi della mastite provocata da *Streptococcus suis* nei ruminanti. Questo lavoro sarebbe quindi un inedito, si tratterebbe della prima volta che si produce ed utilizza un vaccino con questo intento. Naturalmente il monitoraggio dell'efficacia della vaccinazione è ancora agli inizi e quindi sarà necessario attendere per valutare compiutamente questo aspetto. In ogni caso, abbiamo già ottenuto le prime risposte riguardo alla *purezza* e all'*innocuità* del nostro immunogeno. Tutte le prove da noi eseguite hanno confermato il rispetto di

entrambi questi importanti parametri di valutazione. Vorremo premettere che la valutazione dell'efficacia di un vaccino stabulogeno è particolarmente difficoltosa. La potenziale variabilità fra ceppi potrebbe impedire una standardizzazione delle prove. Vaccini stabulogeni allestiti a partire con uno stesso microrganismo (inteso come specie) ma di greggi diversi, potrebbe originare formulazioni potenzialmente diverse fra loro. Di conseguenza alcune valutazioni dovrebbero essere effettuate necessariamente all'interno dello stesso gregge, evenienza che consente di ottenere risultati difficilmente significativi da un punto di vista statistico e difficilmente estendibili ad altri greggi. In queste condizioni quindi, lo status specifico di un allevamento può condizionare in modo determinante le nostre valutazioni. Ricordiamo in proposito che le forme di mastite provocate da germi ambientali ed opportunisti sono condizionate da diversi fattori, per cui, per il risanamento dei greggi non si dovrebbe fare affidamento esclusivamente sull'utilizzo del vaccino stabulogeno, ma si dovrebbe sempre intervenire anche sulla profilassi sanitaria e sul management aziendale. In pratica diverse azioni concorrono al risanamento. Tutto questo condiziona e complica la valutazione dell'efficacia "sul campo" di un vaccino stabulogeno come quello da noi sperimentato. Queste problematiche sono comuni a tutti i vaccini stabulogeni e comunque non hanno impedito di ottenere, col tempo, risposte chiare anche sul parametro dell'*efficacia*. E' questo il recente esempio delle prove effettuate dal nostro Dipartimento di Produzioni sul vaccino stabulogeno contro le mastiti provocate da *Streptococcus uberis* negli ovini e nei caprini. I due vaccini (*Streptococcus uberis* e *Streptococcus suis*) sono allestiti con le stesse procedure cambia ovviamente la specie del microrganismo. Da diversi anni sperimentiamo e valutiamo l'efficacia di questo vaccino sia in greggi sardi che della penisola e ormai i numeri (dosi e allevamenti trattati) e le risposte di veterinari e allevatori nostri collaboratori hanno dimostrato l'efficacia e l'utilità di questo stabulogeno (dati ancora non pubblicati). Nel caso delle infezioni da *Streptococcus suis*, premesso che bisognerà verificare quale può essere l'importanza epidemiologica, la diffusione di queste forme e l'impatto, cioè le perdite che provoca negli allevamenti, pensiamo possa essere vantaggioso percorrere lo stesso percorso seguito per *Streptococcus uberis*. In ogni caso, nella pratica di campo, considerando l'assenza di altri presidi immunologici e i limiti dimostrati dall'approccio terapeutico con antibiotici, riteniamo che il nostro approccio vaccinale, al momento, sia l'unico che possa garantire possibilità di successo. In questa fase la casistica è molto importante, per cui chiediamo a chiunque sia a conoscenza di focolai di mastite negli ovini da *Streptococcus suis* e intenda provare il vaccino, di contattare il Dipartimento di Produzioni dell'Istituto Zooprofilattico della Sardegna e collaborare con esso alla valutazione dell'efficacia dello stabulogeno.

BIBLIOGRAFIA

1. Marogna G., Grünberger L., Fiori A., Nico L., Lollai S., Ziccheddu D., Schianchi G., Leori G. - Vaccino stabulogeno tetravalente contro le mastiti stafilococciche ovine. - In: Atti del XVII Congresso SIPAOC, 2006.
2. Marogna G., Cubeddu G.P., Caria A., Lollai S., Schianchi G., Leori G.S. - Produzione e uso di un vaccino stabulogeno per la profilassi della mastite ovina da *Streptococcus uberis*. - In: Atti VIII Congresso S.I.Di.LV. Perugia 9-10 novembre 2006.
3. Marogna G., Rolesu S., Lollai S., Tola S., Leori S.G. - Clinical findings in sheep farms affected by recurrent bacterial mastitis. - Small Ruminant Research - 88 (2010) 119-125.

COINFEZIONE MAMMARIA DA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E *STREPTOCOCCUS UBERIS* IN UNA PECORA SARDA: A CASE REPORT

¹Marogna G., ²Rocca S., ²Farigu S., ²Cubeddu T., ²Serra G., ¹Barbato A., ¹Fiori A., ¹Schianchi G.

¹Dipartimento di Produzioni dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreff";

²Dipartimento di Patologia e Clinica della Facoltà di Veterinaria di Sassari.

Key words: mastite, piogeni, iperplasia.

ABSTRACT

In this study we show a contemporary infection in a sheep breast with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis*. Both in the clinical that anathistopathological examination we found severe mastitis. The major characteristic in this case was the huge dimensions of mammary gland, the weight of which has reached about 10 Kg (25 % of live weight). The isolation of both bacteria in left that right in the breast of sheep isn't reported in the scientific literature.

INTRODUZIONE

Le mastiti provocate da batteri rappresentano la problematica sanitaria più comune che si deve affrontare negli allevamenti di ovini da latte. I generi batterici principalmente chiamati in causa in queste infezioni sono due: *Streptococcus* e *Staphylococcus*. Lo *Staphylococcus aureus* è, storicamente, il microrganismo patogeno più studiato associato alle mastiti ovine. Questo batterio ha la capacità di infettare la mammella provocando forme diverse, più o meno evidenti, che vanno dalle subcliniche alle gangrenose. Lo *Streptococcus uberis* è un patogeno "emergente" perlomeno negli ovini e la sua diffusione sembra essere associata alla tecnica di mungitura e di allevamento. A conferma del ruolo e della diffusione di questi due patogeni ricordiamo i risultati riportati in un recente lavoro che ha analizzato un campione di greggi sarde con ricorrenti e gravi problemi di mastiti batteriche (1). In questo lavoro lo *Streptococcus uberis* è risultato essere la specie più diffusa (25,6 % dei positivi e il 12,7 % del totale dei campioni esaminati) seguita al terzo posto dallo *Staphylococcus aureus* (13,5 % dei positivi e 6,7 % del totale). Nello stesso lavoro sono state verificate anche le correlazioni eventualmente presenti fra l'isolamento dei microrganismi e i sintomi clinici manifestati dall'animale, ponendo particolare riguardo ai segni clinici mammari. *Streptococcus uberis* è risultato significativamente correlato ($p < 0,05$) con la presenza di frustoli nel secreto, l'aspetto sieroso del latte e la costante reattività dei linfonodi sopramammari. Lo *Staphylococcus aureus* con alcuni segni di mastiti croniche: noduli, ascessi, sclerosi e atrofia ($p < 0,05$). In queste esperienze, non era mai capitato di avere quadri di sovrapposizione fra le due infezioni. Il caso illustrato in questo lavoro è stato evidenziato per pura casualità, durante un sopralluogo in azienda gli autori erano rimasti colpiti dalle ragguardevoli dimensioni della mammella di una pecora con evidenti segni di mastite, e a seguito di questo aspetto inusuale decidevano di effettuare gli esami e gli accertamenti che hanno consentito la diagnosi e la conseguente descrizione del caso.

MATERIALI E METODI

L'animale che ha manifestato la mastite oggetto di questo lavoro apparteneva ad un gregge di pecore di razza Sarda. La mungitura era manuale e la consistenza del gregge attorno ai 400 capi. Non sono stati segnalati altri capi con la stessa sintomatologia. La pecora aveva circa 5 anni di età e presentava una mammella di grandi dimensioni che arrivava a

sforare il suolo, questo stato ne condizionava il movimento che risultava faticoso e molto ostacolato dall'organo. L'animale, chiaramente deperito, evidentemente improduttivo ed incurabile, veniva soppresso. La mammella con il pacchetto dei linfonodi sopramammari venivano destinati agli esami anatomo e istopatologici. In considerazione delle dimensioni ragguardevoli dell'organo si provvedeva a valutare sia il peso vivo dell'animale sia quello della mammella appena asportata subito dopo la soppressione. La mammella pesava 10 Kg, il peso vivo dell'animale era di 41 Kg, ne consegue che il peso dell'organo rappresentava circa un quarto del peso complessivo dell'animale. Non è stata eseguita una autopsia completa della pecora, gli esami anatomopatologici e istopatologici hanno riguardato esclusivamente la mammella e il pacchetto dei linfonodi sopramammari. Dopo l'esame esterno dell'organo si è proceduto con il sezionamento dell'organo e il prelievo dei campioni biotici per l'esecuzione dell'esame microscopico istopatologico. I campioni sono stati fissati in formalina tamponata la 10% e inclusi in paraffina secondo metodiche routinarie. Le sezioni di 3 micron sono state colorate con ematossilina e eosina e Azan Mallory per evidenziare le fibre connettivali. Per l'esame clinico della mammella abbiamo utilizzato il metodo recentemente pubblicato da Marogna et al. nel 2010 (1). Questo metodo prevede il rilievo e la registrazione di diversi parametri clinici sia generali che specifici della mammella. In particolare i segni rilevati all'esame ispettivo della mammella, differenziati per emimammella, comprendono: un esame clinico soprattutto visivo che rileva l'eventuale presenza di pustole, croste, escrescenze cornee, ulcere, noduli, ascessi, rubor, calor e dolor (questi ultimi rispettivamente al termotatto e alla palpazione). L'esame della consistenza mammaria alla palpazione si differenzia in normale, edematosa, sclerotica e atrofica. La valutazione dell'aspetto macroscopico del latte viene differenziato in secreto assente, aspetto normale, sieroso, emorragico, con pus, con frustoli. I prelievi di latte sono stati eseguiti utilizzando una tecnica ormai consolidata che prevede la pulizia del capezzolo con una soluzione disinfettante, l'eliminazione dei primi getti e quindi il prelievo vero e proprio in contenitore sterile. I campioni sono stati differenziati per emimammella. I campioni raccolti venivano prontamente refrigerati, classificati e quindi analizzati. L'esame culturale ha previsto l'analisi di 10 ml di latte inoculati in agar-sangue di montone al 5%. Le piastre sono state incubate a 37 °C per 36-48h, quindi esaminate per la presenza di colonie attribuibili a diversi generi batterici. Sono state annotate le caratteristiche macroscopiche di ciascuna colonia batterica e, quando possibile, si è proceduto a misurarne il diametro alle 24h; è stata verificata l'eventuale presenza, ed il tipo, di emolisi e quindi la reazione al test di produzione della "catalasi". Ai fini dell'identificazione sono state prese in considerazione le principali caratteristiche fenotipiche della batteriologia "classica": l'osservazione microscopica con la colorazione di Gram, quindi, per i "catalasi-positivi", la crescita e la fermentazione in terreno Mannitol Salt Agar (MSA), la

produzione di coagulasi "legata" o "clumping factor" (Staphylase Test, Oxoid) e di coagulasi "libera" (BBL Coagulase Plasma Rabbit con EDTA, BD), la crescita e le reazioni in terreno Baird-Parker RPF (*Rabbit Plasma Fibrinogen*) Agar (Microbiol) e, in alcuni casi, la produzione di DNAsi termostabile; mentre, per i batteri dimostratisi "catalasi-negativi", abbiamo preso in considerazione la reazione di idrolisi dell'esculina in terreno Bile Esculine Agar (BEA) e l'appartenenza ai gruppi di Lancefield (Streptococcal Grouping Kit, Oxoid). Per tutti i ceppi batterici si è proceduto all'identificazione tramite test biochimici multipli (API-Staph e API-20 Strep, bioMérieux) e i profili ottenuti sono stati interpretati con il sistema apiweb® (bioMérieux). Tutte le identificazioni biochimiche sono state confermate con specifiche tecniche biomolecolari (1-2-3).

RISULTATI

- All'esame colturale del latte, i campioni di entrambe le emimammelle erano positivi alla crescita di batteri su agar sangue. A 24 ore di incubazione su entrambe le piastre era evidente la crescita di due popolazioni macroscopicamente differenti, una caratterizzata da colonie di più grandi dimensioni e relativamente poco numerose, un'altra da colonie piccole ma molto numerose. A seguito delle identificazioni, sia biochimiche che biomolecolari, le prime risultavano essere degli *Staphylococcus aureus* le altre degli *Streptococcus uberis*.
- All'esame clinico, entrambe le emimammelle risultavano interessate, anche se l'emimammella di sinistra appariva di dimensioni minori rispetto alla controlaterale. La cute della mammella appariva tesa e in alcuni distretti escoriata ed arrossata. Alla palpazione dell'organo l'animale non manifestava reazioni dolorose. Le dimensioni e la consistenza dell'organo non consentivano una palpazione profonda. Il linfonodo sopramammario era molto reattivo. Il secreto mammario appariva emorragico ai primi getti, per poi divenire sieroso-purulento; nel secreto erano evidenti dei frustoli caseifici. All'esame generale, la pecora appariva magra (BCS 2,25), vigile ma poco reattiva agli stimoli, probabilmente perché stremata.
- All'esame anatomo-patologico, macroscopicamente l'organo si presentava aumentato di volume con aree eritematose e zone di scarificazione ed escare a livello della cute, presumibilmente di origine traumatica. Alla sezione della cisterna del latte per la verifica del contenuto, l'interno di entrambe le cisterne presentava una cospicua quantità di liquido sieroso-purulento molto fluido. Sul fondo della cisterna era possibile rinvenire una discreta quantità di grumi costituiti da proteine del latte precipitate. L'esame delle restanti parti dell'organo non presentava particolari evidenze se non una atrofia del parenchima ghiandolare e una iperplasia linfonodale.
- Microscopicamente si sono evidenziati due quadri, il primo era caratterizzato dalla presenza di numerosi neutrofili a livello degli alveoli e da una componente cellulare linfatica a livello interstiziale. Il secondo quadro era caratterizzato da una grave sclerosi e atrofia del parenchima secernente da imputare sia a fenomeni compressivi che necrotici.

DISCUSSIONE

Il quadro osservato è quello di una grave mastite siero-purulenta con evidenti fenomeni di sclerosi e atrofia. Ciò che è emerso dalle considerazioni eseguite sull'esame microscopico è che il processo in atto si protraveva già da un certo tempo assumendo l'andamento di un fenomeno cronico (testimoniato dalla notevole presenza di cellule linfoplasmocitarie interstiziali), non perdendo però i connotati di una flogosi purulenta sempre attiva, probabilmente a causa di almeno un agente patogeno che assume il carattere di un batterio piogeno. Le considerevoli dimensioni dell'organo e della raccolta sierosa sono da imputare ad una difficoltà nella eliminazione dell'essudato e del secreto mammario a causa della grave sclerosi dell'organo che ha compromesso, sia la funzionalità dei capezzoli che del sistema di linfodrenante. Le lesioni riscontrate sia all'esame clinico che a quello anatomopatologico e istopatologico sono risultate diffuse e invalidanti. Caratteristico di questo caso l'elevata dimensione raggiunta dalla mammella mastitica che ha pesato da sola 10 Kg, circa ¼ del peso vivo complessivo dell'animale. L'isolamento contemporaneo di questi due patogeni nel secreto di entrambe le emimammelle di una pecora non era mai stato descritto prima in letteratura.

BIBLIOGRAFIA

1. Marogna G., Rolesu S., Lollai S., Tola S., Leori S.G. - Clinical findings in sheep farms affected by recurrent bacterial mastitis. – Small Ruminant Research – 88 (2010) 119-125.
2. Onni T., Sanna G., Cubeddu G.P., Marogna G., Lollai S., Leori G., Tola S. – Identification of coagulase-negative staphylococci isolated from ovine milk samples by PCR-RFLP of 16S rRNA and gap genes – Vet. Microbiol. - 2010 jan 28
3. Campesi F., Marogna G., Uzzau S., Leori G.S. - Allestimento e uso di un metodo Multiplex-PCR per la diagnosi di *Streptococcus uberis* e *Enterococcus faecalis* da latte ovino – In atti del X Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. , Alghero (SS) 22-24 ottobre 2008



DESCRIZIONE CLINICA DI UN FOCOLAIO DI MASTITE OVINA DA *STREPTOCOCCUS SUIIS*

¹Marogna G., ²Bacciu D., ³Salis F., ¹Fiori A., ²Uzzau S., ¹Schianchi G.

¹Dipartimento di Produzioni dell'Istituto Zooprofilattico sperimentale della Sardegna "G. Pegreffi";

²Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università di Sassari; ³Veterinario della Mangimi Martini SpA.

Key words: noduli mammari, linfonodi sopramammari, PCR.

ABSTRACT

In this study we describe an array of clinical signs observed in sheep mammary glands following an epidemic outbreak of *Streptococcus suis* infection. To our knowledge there are no previous studies reporting similar clinical lesions associated to this species in sheep. The casual agent has been isolated in milk collected from 18 ewes with clinical signs of mastitis. Cultured *Streptococcus suis* strains have been identified by PCR with species-specific primers. We speculate that the pathogen disseminated within the sheep flock from infected swine that were reared in the same farm. This *Streptococcus suis* epidemic outbreak is currently under investigation and its clinical characters will be further analysed.

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni si fanno sempre più frequenti le segnalazioni di mastiti negli ovini causate da infezioni di streptococchi. E' probabile che queste segnalazioni siano la conseguenza delle mutate condizioni di allevamento degli ovini da latte, caratterizzate, perlomeno in Sardegna, dal graduale passaggio dal brado alla stabulazione. In queste condizioni, germi ambientali ed opportunisti, come gli streptococchi, trovano le condizioni ideali per la loro sopravvivenza. Gli agenti eziologici appartenenti a questa famiglia e associati a mastiti ovine, perlomeno nei lavori più recenti, sono principalmente due: lo *Streptococcus uberis* e l'*Enterococcus faecalis*. In questo lavoro noi presentiamo un focolaio esteso di mastiti negli ovini provocato da una "nuova" specie: lo *Streptococcus suis*. In bibliografia sono rarissime le segnalazioni di questa specie batterica associata ad infezioni nei ruminanti. In un lavoro del 1988 lo *Streptococcus suis* è stato citato fra i responsabili di lesioni alla cute della mammella (1). In Sardegna, nell'ambito di un progetto ministeriale dal titolo: "La diagnosi, la patogenesi e la profilassi di alcune mastiti cliniche e subcliniche degli ovini negli allevamenti tradizionali e biologici" (IZSSA 05/04 RC), abbiamo eseguito (anno 2006) un campionamento su allevamenti ovini affetti da ricorrenti problemi di mastiti batteriche. In questa ricerca abbiamo segnalato l'isolamento di *Streptococcus suis* nel latte di alcuni capi e rilevato i segni clinici manifestati (2-3). Nella stessa ricerca avevamo messo a punto delle PCR specifiche per la conferma diagnostica di tutte le specie di streptococchi isolati nel lavoro (9 specie diverse appartenenti ai generi *Streptococcus* e *Enterococcus*), compreso *Streptococcus suis*. Il rilievo di questo batterio appariva comunque sporadico e scarsamente significativo da un punto di vista epidemiologico. Al contrario, nel lavoro che stiamo presentando, descriviamo i rilievi clinici sulla mammella registrati in un focolaio esteso di mastite da *Streptococcus suis*, in un gregge della Sardegna centrale, nel quale venivamo chiamati per risolvere alcuni insuccessi vaccinali e quindi per provare l'efficacia di uno specifico vaccino stabulogeno. Che ci risulti, questo nostro lavoro rappresenta la prima descrizione clinica di un focolaio di mastite nelle pecore causato da *Streptococcus suis*.

MATERIALI E METODI

L'infezione è stata rilevata in un allevamento della Sardegna centrale. In azienda venivano allevati due greggi, uno di ovini di razza Sarda e uno di capre. I due greggi, seppur tenuti separati, condividevano pascoli e spazi aziendali. Nel centro aziendale venivano contemporaneamente allevati dei suini per la maggior parte tenuti liberi di muoversi a piacimento. Gli animali erano così ripartiti: Suini (circa 50 scrofe), Ovini (500 adulte in mungitura, 50 adulte in asciutta, 165 giovani non partorite, 250 di rimonta), Capre (205 adulte in mungitura e 50 di rimonta). Sia gli allevatori che il veterinario aziendale ci informavano circa una diffusa ed invalidante mastite che colpiva gli ovini e che aveva provocato ingenti danni alla produzione del latte e lo scarto di circa 140 soggetti a causa di gravissime lesioni mammarie. Al momento della nostra prima visita molti animali (50) si trovavano già in asciutta. Nel gruppo di mungitura abbiamo sottoposto a visita circa un centinaio di capi, di questi, venti pecore, scelte fra quelle che presentavano lesioni cliniche più importanti, venivano selezionate per i prelievi di latte. Lo schema di esame clinico e la tecnica di prelievo utilizzati sono quelli descritti da Marogna et al. nel 2010 (3). L'esame clinico della mammella si eseguiva dopo la mungitura, veniva differenziato per emimammella e comprendeva: un esame ispettivo, la valutazione della consistenza della emimammella e dell'aspetto macroscopico del latte munto, l'esame dei linfonodi sopramammari e l'eventuale presenza di "lùpia", una mastopatia fibrocistica di eziologia non nota, di riscontro relativamente frequente nei nostri allevamenti da latte. L'esame ispettivo valutava la presenza di: pustole, croste, escrescenze cornee, ulcere, noduli, ascessi, *rubor*, *calor* e *dolor* (questi ultimi 3 rispettivamente al termotatto e alla palpazione). La consistenza mammaria alla palpazione veniva differenziata in: normale, edematosa, sclerotica e atrofica. L'aspetto macroscopico del latte veniva differenziato in: normale, sieroso, emorragico, con pus, con frustoli, secreto assente.

Il prelievo di latte veniva eseguito seguendo quanto descritto da Marogna et al. nel 2010 (3), in questa sede riteniamo importante ricordare che il campione di latte è unico per animale e viene costituito da una miscela del secreto delle due emimammelle. L'esame culturale prevedeva l'inoculo di 10 µl di latte in piastre di agar-sangue di montone al 5%, incubate a 37 ± 1 °C per 24-48h. Sulle piastre positive alla crescita, si procedeva all'isolamento di una colonia per le identificazioni di tipo fenotipico. Quando su uno stesso campione cresceva più di un genere, questo veniva catalogato come "flora microbica varia" e non si procedeva alle identificazioni di specie. Queste comprendevano la colorazione di Gram, i test della coagulasi e della catalasi. Queste indagini sono servite principalmente per discriminare fra i due gruppi normalmente chiamati in causa nelle mastiti batteriche delle pecore: gli stafilococchi e gli streptococchi. Le colture sono state quindi esaminate per la presenza di colonie attribuibili al genere *Staphylococcus* (catalasi positivi e Gram-positivi caratterizzati dalla disposizione in "cluster" delle cellule) o *Streptococcus* e *Enterococcus* (catalasi negativi e Gram-positivi). A questo punto non si è proceduto all'identificazione tramite test biochimici multipli ma si è passati all'estrazione del DNA e alla identificazione con PCR.

Il DNA è stato estratto da ciascun ceppo attraverso la metodica della bollitura (boiling-prep). A tale scopo alcune colonie di ciascun ceppo sono state stemperate in 100 µl di H₂O milliQ sterile ed incubate a 100°C per 10 minuti. Dopo centrifugazione in una microcentrifuga a 12000 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente, il surnatante, contenente il DNA è stato trasferito in un tubino sterile ed utilizzato per le reazioni di PCR. Si è proceduto all'allestimento di PCR per l'identificazione di *Streptococcus suis* basata sull'utilizzo di primers specie-specifici che permettono l'amplificazione di una porzione di DNA specifica per ogni singola specie batterica. I primers sono stati disegnati sulla sequenza delle regioni variabili del DNA ribosomale (rDNA) 23S dell'operone dell'RNA ribosomale (rRNA) che è costituito da un alternarsi di regioni costanti e regioni variabili. I primers per *S. suis* erano già descritti in letteratura. La tabella 1 di seguito riportata mostra i primers utilizzati per la singola specie e le dimensioni degli ampliconi.

Il DNA batterico è stato amplificato in un volume finale di 25 µl, contenente 10mM Tris HCl pH 8.8, 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl, 0.1% triton X-100, 200 µM di ciascun desossiribonucleotide, 0.5 unità di DyNzyme DNA Polymerase (FINNZYMES) e 0.075 µM di ciascun primer. La reazione è stata effettuata utilizzando 3µl di DNA. La miscela di reazione è stata sottoposta al seguente ciclo termico di amplificazione genica: 5' a 94°C, seguiti da 30 cicli di 1' a 94°C, 1' a 56°C, 1' a 72°C, ed una estensione finale di 10' a 72°C. I prodotti di PCR sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1.5% in TAE Buffer e visualizzati con bromuro d'etidio su un transilluminatore a raggi UV. Come standard di peso molecolare è stato usato 1Kb DNA ladder (Gibco).

RISULTATI

• Clinica

Venivano sottoposte a visita clinica 96 pecore in mungitura (19,2 % delle adulte in mungitura), di queste presentavano segni clinici evidenti 51 capi (53 % degli animali esaminati).

Il 100 % di questi capi presentava noduli mammari e reattività linfonodali. Il 32 % presentava atrofia monolaterale e tre capi aspetto macroscopico del secreto mammario sieroso e con contemporanea presenza di frustoli caseinici. Le dimensioni dei noduli variavano fra quelle di un pisello e quelle di una arancia. La presenza di noduli di piccole dimensioni era associata a formazioni "a grappolo", diffuse nel parenchima di entrambe le emimammelle. Al contrario la presenza di grossi noduli interessava quasi esclusivamente un'unica emimammella e in questa si evidenziava un unico grosso nodulo. Notevole la reattività dei linfonodi sopramammari, tutto il pacchetto linfonodale risultava interessato e le sue dimensioni raggiungevano spesso quelle di una arancia. La maggior parte delle lesioni era così evidente da potere essere ben visibile anche ad occhi nudo ben prima della palpazione. Non venivano rinvenuti altri segni clinici di particolare rilievo, in particolare, nella quasi totalità delle mammelle, la cute non appariva arrossata e gli animali non mostravano reazioni (dolor) alla palpazione. Non si rinvenivano ne pustole ne croste. Al momento del nostro esame, nessun nodulo appariva fistolizzato. Gli animali apparivano in ottimo stato di

nutrizione ed apparentemente non manifestavano evidenti segni di deperimento generale.

• PCR

Su 20 campioni esaminati, 18 sono risultati positivi alla crescita batterica su agar sangue e due negativi. Il 100% dei campioni esaminati in PCR sono risultati essere *Streptococcus suis*.

DISCUSSIONE

E' la prima volta che gli autori si imbattono in un focolaio esteso di mastite da *Streptococcus suis* negli ovini. Non ci risultano altre segnalazioni di questa entità. Veterinario aziendale e allevatori ci hanno dichiarato che nella stagione in corso avevano già scartato e macellato 140 pecore adulte a causa delle importanti ed invalidanti lesioni manifestate. La maggior parte degli animali scartati presentavano i noduli da noi descritti, è quindi ipotizzabile che parte significativa di essi potesse essere infetta dallo stesso microorganismo. Siamo anche stati informati circa gli insuccessi registrati a seguito delle diverse terapie antibiotiche praticate e che, a causa di questi insuccessi, da almeno due mesi precedenti il nostro ingresso in azienda (giugno 2011) non si praticavano più terapie per la mastite. Le lesioni nodulari da noi accertate sono gravi ed invalidanti, l'indicazione sanitaria non può non essere lo scarto e la riforma dall'allevamento. Gli animali venivano munti a macchina con un impianto a lattodotto da 48 poste, regolarmente controllato. In considerazione della promiscuità fra le greggi e i suini allevati in azienda è probabile che essi possano essere la fonte di infezione negli ovini, tuttavia accertamenti in proposito sono ancora in corso e l'ipotesi ad oggi non può essere confermata. Riteniamo che questa segnalazione rappresenti una indicazione epidemiologica importante. La diffusione e la gravità delle lesioni descritte dovrebbero promuovere ricerche più estese e più approfondite sia di natura epidemiologica che patogenetica. Parallelamente alla clinica e nel tentativo di controllare la diffusione dell'infezione, abbiamo deciso, in accordo con allevatori e veterinario aziendale, di sperimentare l'efficacia di un vaccino stabulogeno allestito a partire dai ceppi da noi isolati. Il monitoraggio di questa vaccinazione è attualmente in corso. Riteniamo sottolineare quanto sia importante, nell'ambito della prova vaccinale, monitorare clinicamente gli animali e valutare direttamente le condizioni dell'allevamento e il management aziendale. Questa pratica consente di avere un quadro d'insieme che, nella nostra esperienza, è fondamentale per il risanamento dell'allevamento.

Bibliografia

1. Hommez J, Wullepit J, Cassimon P, Castryck F, Ceyssens K, Devriese LA. - *Streptococcus suis* and other streptococcal species as a cause of extramammary infection in ruminants. Vet. Res. 1988 Dec 10;123(24):626-7.
2. Gavino Marogna, Sandro Rolesu, Stefano Lollai, Sebastiana Tola, Sisinnio Guido Leori - Quadri clinici in allevamenti ovini con gravi problemi di mastopatie - Large Animal Review, supplemento al n. 4, agosto 2008, Anno 14.
3. Marogna G., Rolesu S., Lollai S., Tola S., Leori S.G. - Clinical findings in sheep farms affected by recurrent bacterial mastitis. - Small Ruminant Research – 88 (2010) 119-125.

Tabella 1

Specie	Primers	Sequenza (5'-3')	Dimensione ampliconi
<i>S.suis</i> 2	sui2F	TAATAGCCCTGTAGTCGAAATCGAT	542bp
	sui2R	GCTCTACCTCCAAGAATCTTTATG	

PRODUZIONE, USO ED EFFICACIA SUL CAMPO DI UN VACCINO STABULOGENO PER LA PROFILASSI DELLA PIODERMITE SUINA DA *STAPHYLOCOCCUS HYICUS*

¹Marogna G., ²Salis F., ¹Barbato A., ¹Schianchi G.

¹Dipartimento di Produzioni dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreffi"; ²Veterinario della Mangimi Martini Spa

Key words: suinetti, dermatite pustolosa, follicolite suppurativa

ABSTRACT

In this work, we describe the successful eradication plan performed on a pig farming where the piglets were affected by widespread skin infection caused by *Staphylococcus hyicus*. The outbreak was characterized by high mortality and morbidity. Antimicrobial therapy were used without success. The eradication plan was obtained administering a specific auto-vaccine to all pig adults. After the first vaccination, we didn't observe other clinical cases. This was still confirmed after six months from first vaccination.

INTRODUZIONE

Le infezioni da *Staphylococcus hyicus* nel suino sono state descritte da tempo. La forma clinica classica viene chiamata *epidermide essudativa dei suinetti*. Si tratta di una dermatite acuta, spesso mortale, dei suinetti neonati. La sintomatologia appare più lieve nei suinetti dopo lo svezzamento e spesso asintomatica negli adulti. Sono fattori predisponenti sia la presenza di soluzioni di continuo cutanee che uno stato di nutrizione scadente. Gli studi sulla patogenesi del microrganismo hanno dimostrato la produzione di una tossina esogena che ha la capacità di legarsi alla *filaggrina* nei granuli cheratoinali dello strato granuloso dell'epidermide. Si pensa che questo legame sia la causa dell'erosione focale dello strato corneo. La *filaggrina* è una proteina la cui funzione è quella di aggregare in fasci spessi, le *tonofibrille*, i filamenti di *cheratina*. Questi granuli potrebbero contenere anche *loricrina* che assieme alla precedente contribuisce a formare l'involucro interno corneificato. A seguito di questa prima lesione si sviluppa una dermatite frequentemente caratterizzata da essudato brunastro attorno agli occhi, ai padiglioni auricolari, al grugno e alle parti più distali degli arti. Le lesioni tipiche sono quelle di una dermatite pustolosa subcorneale che si estende al follicolo pilifero e che esita in una follicolite superficiale *suppurativa*. Obiettivo di questo lavoro è stato quello di produrre, utilizzare e valutare l'efficacia "in campo" di un vaccino stabulogeno per *Staphylococcus hyicus*. Il vaccino è stato utilizzato in occasione di un grave ed esteso focolaio registrato in un allevamento di suini di razza Sarda gestiti con sistema "en plain air" nel sud della Sardegna.

MATERIALI E METODI

Il focolaio da noi monitorato si è sviluppato in un allevamento di suini di razza Sarda gestito con sistema "en plain air". L'allevamento era composto da circa 40 scrofe. Attorno al mese di aprile del 2011 una decina di scrofe partorivano una serie di suinetti, apparentemente normali alla nascita, che in brevissimo tempo si ammalavano presentando una dermatite pustolosa diffusa praticamente in tutto il corpo. In pochi giorni, gli animali deperivano (in alcuni casi compariva anche diarrea) e venivano a morte. Alcuni soggetti riuscivano a sopravvivere alla fase più acuta e si trascinavano per qualche settimana. Questi soggetti oltre alle lesioni pustolose evidenziavano anche croste di cheratina su pustole in via di guarigione. I soggetti apparivano magri, con scarsissimo accrescimento,

abbattuti. Pochi di questi capi riuscivano a raggiungere il mese di età. Nessun soggetto guariva. Nessuno dei trattamenti antibiotici utilizzati dall'allevatore, coadiuvato dal veterinario di campo, riusciva a controllare l'infezione. Nessun soggetto adulto manifestava segni clinici di malattia. In allevamento non esistono soggetti all'ingrasso, i suinetti vengono tutti venduti a circa 30-35 giorni di età.

Il nostro protocollo di intervento ha previsto l'esecuzione di tamponi dalle pustole dei suinetti. Abbiamo prelevato sia con tamponi asciutti che con tamponi immersi in terreno di trasporto. La tecnica ha previsto la pulizia di alcune grosse pustole utilizzando garze imbevute di alcool denaturato e quindi la rottura delle pustole con pinzette sterili. Sul materiale fuoriuscito si eseguiva il tampone. Sono stati prelevati 10 tamponi da 5 suinetti diversi, scelti fra quelli che non avevano subito trattamenti antibiotici e che presentavano le pustole di più grandi dimensioni. Il nostro esame colturale ha previsto la semina dei campioni su piastre di agar-sangue di montone defibrinato (5%) ed incubazione a 37°C per 36-48 ore. Dalle piastre sulle quali si evidenziava una crescita microbica, si procedeva al prelievo degli isolati e all'identificazione del genere: striscio su vetrino e colorazione di Gram; test della *catalasi*, della *coagulasi* e tipizzazione finale, che veniva raggiunta utilizzando il test Api Staf. (Bio-Merieux, France).

Alla fine di questa fase, le colonie identificate come *Staphylococcus hyicus*, potevano essere clonate e amplificate per la preparazione del vaccino stabulogeno. Una prima amplificazione consisteva nello stemperare in Nutrient Broth (Oxoid) un inoculo abbondante dell'agente patogeno il cui clonaggio era stato eseguito su agar-sangue; quindi si procedeva alla semina dell'agar nutritivo di crescita (*Tryptose*, *Lab-lemco Oxoid*, *Agar in fili* – C. Erba- NaCl, *Glucosio Acqua demineralizzata di grado bidistillato*) su un numero di *scatole di Roux* proporzionale alla quantità di antigene necessaria alla preparazione delle dosi di vaccino da inoculare agli animali, ed incubando per 24 h a 37°C. Il controllo della purezza della sospensione veniva effettuato eseguendo una nuova semina in piastra di agar-sangue. La patina batterica veniva raccolta con soluzione fisiologica sterile e diluita, sempre in soluzione fisiologica sterile fino ad ottenere la una concentrazione di stafilococchi di 10⁹ UFC/ml. A questo volume di sospensione, si aggiungeva come adiuvante *idrossido di alluminio* al 10% e quindi, si lasciava la soluzione in agitazione per circa 2 ore. L'inattivazione veniva attuata con *Formalina F:U* al 35% m/m (Carlo Erba) alla concentrazione finale del 0.04%, così come previsto dalle linee guida per la preparazione dei vaccini stabulogeni che uniformano le metodiche di produzione fra i diversi Istituti Zooprofilattici.

L'intero volume della sospensione così ottenuta veniva incubato a 37°C, in agitazione, per 24 ore, quindi veniva effettuato il controllo dell'inattivazione mediante semina su terreni liquidi e solidi per agenti aerobi, anaerobi, micoplasmi lieviti e muffe. Successivamente veniva confezionato sterilmente in flaconi sterili da 250 ml. I controlli di sterilità del prodotto confezionato sono stati effettuati mediante semina sugli stessi terreni

utilizzati per la verifica dell'inattivazione.

1) agar sangue per verificare una eventuale crescita di batteri aerobi;

2) *Sabouraud* (Oxoid, U.K.) per verificare la crescita delle muffe;

3) Thioglicolate Broth (Oxoid) per verificare la crescita degli anaerobi;

4) Hayflick agar per verificare l'eventuale crescita di micoplasmi;

Nella nostra procedura il controllo della tossicità su animali di laboratorio (topino), necessario per i rilievi legati al tipo di inattivante chimico utilizzato, viene saggiato ogniqualvolta si utilizza una nuova partita di Formalina e di nuove materie prime.

Sul campo, il vaccino è stato inoculato su tutto l'effettivo degli animali adulti (scrofe e verri).

Il vaccino è stato somministrato per via intramuscolare profonda. Abbiamo richiamato la vaccinazione un mese dopo la prima inoculazione. La dose di inoculo è stata di 2 ml per capo. Dal momento della prima vaccinazione veniva sospeso l'utilizzo degli antibiotici. Si è previsto di richiamare il vaccino ogni 5 mesi, sempre su tutto l'effettivo degli animali adulti.

RISULTATI

- Controlli fisico-chimici: la sospensione vaccinale non ha evidenziato formazione di grumi o comunque di alterazioni particolari dell'aspetto, il valore finale di pH è stato 6.1

- Controlli microbiologici: nei controlli di purezza con agar sangue si è re-isolato esclusivamente lo *Staphylococcus hyicus*.

- Controllo della sterilità: non è stata evidenziata alcuna crescita. Analogamente, nella semina degli altri terreni colturali (Sabouraud, Thioglicolate e Hayflick) non è stata mai evidenziata crescita.

- Controlli sul campo: non si sono evidenziate reazioni nel punto di inoculo e nelle 24 ore successive all'inoculazione i soggetti vaccinati non hanno manifestato segni clinici comunque riferibili alla vaccinazione.

- Efficacia: a partire dalla seconda vaccinazione (primo richiamo) nessun suinetto ha più manifestato segni di

malattia. A sei mesi dalla prima vaccinazione, il risultato è stato confermato, nessun soggetto ha più manifestato sintomi riferibili ad infezione da *Staphylococcus hyicus*.

DISCUSSIONE

Il fatto che le condizioni di allevamento e più in generale il management non abbiano subito modifiche e che non si siano più praticate terapie antibiotiche, rafforza l'evidenza dell'*efficacia* "sul campo" dimostrata dalla nostra vaccinazione. Il vaccino, come del resto atteso per uno stabulogeno spento, si è dimostrato assolutamente *innocuo*, non abbiamo mai verificato reazione al punto di inoculo e mai verificato stati di malessere eventualmente riconducibili all'inoculazione. Una delle incognite che volevamo verificare con questa vaccinazione riguardava l'utilizzo dell'*idrossido di alluminio* come adiuvante. Precedenti esperienze con questo prodotto maturate nell'ambito di vaccinazioni che prevedevano inoculazioni sottocutanee avevano dato risultati molto negativi; la maggior parte dei soggetti, fossero essi adulti o suinetti, manifestavano tumefazioni dolorose e ascessi al punto di inoculo. In questa nostra prova, l'inoculazione intramuscolare profonda sembra avere escluso ogni tipo di reazione avversa.

Abbiamo voluto descrivere il risanamento di questo focolaio nei suini per evidenziare quale può essere l'importanza e l'apporto che si può avere in allevamento dall'utilizzo di un vaccino stabulogeno specifico. Questo caso ci sembrava emblematico, il problema (mortalità dei suinetti) è stato risolto in circa un mese, senza utilizzo di antibiotici, senza problemi di residui e di tempi di sospensione. Anche da un punto di vista economico, a detta dell'allevatore, la scelta dell'utilizzo dei vaccini stabulogeni si è dimostrata molto conveniente. Tutto considerato noi auspichiamo che anche nell'allevamento suino (come già avvenuto in quello ovino e caprino) ci sia una riscoperta e una rivalutazione dei benefici che si possono ottenere con l'utilizzo dei vaccini stabulogeni. Il personale veterinario del Dipartimento di Produzioni dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna è disponibile per informazioni, consulenze e produzioni riguardanti i vaccini stabulogeni utilizzabili negli allevamenti suini.

Foto 1



Foto 2



Foto 3



RELAZIONE FRA: VUOTO NECESSARIO ALL'APERTURA DELLO SFINTERE DEL CAPEZZOLO, SEGNI CLINICI MAMMARI ed ESAMI COLTURALI DEL LATTE IN OVINI SARDI

¹Marogna G., ²Casu S., ¹Pilo C., ²Sechi S., ²Tolu S., ²Saccu C., ²Carta A., ¹Schianchi G.

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreffi"; ²Agris Sardegna.

Key words: vacuometro, mastite, batteri

ABSTRACT

In this study, we verified the effect between the vacuum levels required to open the teat sphincter, the presence of clinical signs and of intramammary infection in udders in a Sarda breed flock. The aim was to verify the hypothesis that a low resistance to the opening of the teat sphincter could predispose the udder of sheep to bacterial infections. The hypothesis has been partially confirmed but needs further investigations. However, this work suggests a possible genetic selection of sheep less susceptible to mastitis based on functional features of the teat sphincter.

INTRODUZIONE

Normalmente i batteri che infettano la mammella degli ovini colonizzano l'organo "per risalita" cioè penetrando dal capezzolo. Lo sfintere del capezzolo rappresenta la prima barriera alla risalita dei patogeni all'interno della ghiandola mammaria. Allo stesso tempo, lo sfintere costituisce il limite fisico al flusso del latte durante la mungitura. Teoricamente flussi di emissione del latte elevati sono auspicabili per una rapida mungitura dell'animale, con intuitivi vantaggi sia nella mungitura manuale che in quella meccanica. Tuttavia nei bovini è stato dimostrato che flussi di emissione elevati sono spesso associati ad alti valori di cellule somatiche del latte (1-2-3). Sempre nei bovini (4) è stato verificato che le vacche con flussi di emissione del latte più alti possono avere maggiori probabilità di manifestare infezioni mammarie rispetto a quelli con flusso debole. Negli ovini è stato dimostrato che esiste una correlazione fenotipica negativa tra la misura del vuoto necessario all'apertura del capezzolo (VOS) e il flusso di emissione del latte medio e massimo e tra il VOS e il contenuto in cellule somatiche del latte (5-6). Tutto ciò considerato, nell'ambito di un progetto di ricerca corrente (IZS SA 002/07) dal titolo "*I geni di resistenza e il ruolo dei mediatori dell'infiammazione nelle mastiti ovine*" abbiamo indagato sulle correlazioni eventualmente esistenti fra: il vuoto necessario all'apertura dello sfintere del capezzolo (VOS) per ottenere i primi getti di latte, i risultati di un dettagliato esame clinico della mammella e i risultati degli esami microbiologici del latte di uno specifico gregge. Le misurazioni sono state condotte su una popolazione sperimentale ben definita e i lavori sono durati circa 2 anni.

MATERIALI E METODI

Per l'esame clinico della mammella abbiamo utilizzato il metodo recentemente pubblicato da Marogna et al. nel 2010 (7). Questo metodo prevede il rilievo e la registrazione di diversi parametri clinici sia generali che specifici della mammella. In particolare i segni rilevati all'esame ispettivo della mammella, differenziati per emimammella, comprendono: un esame clinico soprattutto visivo che rileva l'eventuale presenza di pustole, croste, escrescenze cornee, ulcere, noduli, ascessi, rubor, calor e dolor (questi ultimi rispettivamente al termotatto e alla palpazione). L'esame della consistenza mammaria alla palpazione si

differenzia in normale, edematosa, sclerotica e atrofica. La valutazione dell'aspetto macroscopico del latte viene differenziato in secreto assente, aspetto normale, sieroso, emorragico, con pus, con frustoli. I prelievi di latte sono stati eseguiti utilizzando una tecnica ormai consolidata che prevede la pulizia del capezzolo con una soluzione disinfettante, l'eliminazione dei primi getti e quindi il prelievo vero e proprio in contenitore sterile. Il campione raccolto veniva prontamente refrigerato, classificato, aliquotato e quindi inviato ai competenti laboratori per le analisi. L'esame colturale ha previsto l'analisi di 10 µl di latte inoculati in agar-sangue di montone al 5%. Le piastre sono state incubate a 37 °C per 36-48h, quindi esaminate per la presenza di colonie attribuibili a diversi generi batterici. Sono state annotate le caratteristiche macroscopiche di ciascuna colonia batterica e, quando possibile, si è proceduto a misurarne il diametro alle 24h; è stata verificata l'eventuale presenza, ed il tipo, di emolisi e quindi la reazione al test di produzione della "catalasi". Ai fini dell'identificazione sono state prese in considerazione le principali caratteristiche fenotipiche della batteriologia "classica": l'osservazione microscopica con la colorazione di Gram, quindi, per i "catalasi-positivi", la crescita e la fermentazione in terreno Mannitol Salt Agar (MSA), la produzione di coagulasi "legata" o "clumping factor" (Staphylase Test, Oxoid) e di coagulasi "libera" (BBL Coagulase Plasma Rabbit con EDTA, BD), la crescita e le reazioni in terreno Baird-Parker RPF (*Rabbit Plasma Fibrinogen*) Agar (Microbiol) e, in alcuni casi, la produzione di DNAsi termostabile; mentre, per i batteri dimostratisi "catalasi-negativi", abbiamo preso in considerazione la reazione di idrolisi dell'esculina in terreno Bile Esculine Agar (BEA) e l'appartenenza ai gruppi di Lancefield (*Streptococcal Grouping Kit*, Oxoid). Per tutti i ceppi batterici si è proceduto all'identificazione tramite test biochimici multipli (API-Staph e API-20 Strep, bioMérieux) e i profili ottenuti sono stati interpretati con il sistema *apiweb*® (bioMérieux).

Per quanto concerne alla cinetica di emissione del latte, la misura del VOS è stata registrata con un vacuometro strumento che permette di applicare livelli di vuoto crescenti allo sfintere del capezzolo e di misurare i Kilopascal (kPa) necessari a provocarne l'apertura e quindi la fuoriuscita dei primi getti di latte. Il VOS è stato misurato esclusivamente sulle emimammelle di destra.

Sono state poste a confronto le medie dei valori del VOS in funzione della presenza/assenza dei parametri clinici esaminati e del risultato dell'esame batteriologico del latte. Sono stati sottoposti ad analisi statistica solo i parametri per i quali erano state riscontrate almeno 10 positività all'esame clinico della mammella. Dal momento che la distribuzione dei valori del VOS è risultata non differire significativamente dalla normale (Kolmogorov-Smirnov Test, $p > 0,05$), il confronto delle medie è stato effettuato mediante il T Student Test. È stata ammessa significatività statistica quando $p < 0,05$. L'analisi statistica è stata effettuata mediante S.P.S.S. ver. 15.0.0.

RISULTATI

I rilievi hanno interessato due stagioni produttive (anni 2008-2009). Il numero delle secondipare sottoposte a verifiche è stato di 250 il primo anno e 239 il secondo. Per quanto concerne i segni clinici abbiamo rilevato almeno un segno su 156 capi nel primo anno e 137 capi nel secondo. Nel primo anno sono risultati positivi agli esami colturali del latte 37 campioni su 250 capi esaminati e nel secondo 1 su 239 esaminati (5 campioni hanno presentato flora microbica varia). Nella Tabella sono riportate le medie \pm deviazione standard dei valori del VOS in funzione dei risultati dei parametri clinici indagati alla visita e la significatività statistica.

Parametri	N.	Media \pm ds	p
Mammella destra			
Noduli			
Presenti	12	24,01 \pm 10,20	>0,05
Assenti	477	23,59 \pm 7,62	
Consistenza			
Normale	430	23,88 \pm 7,64	0,03
Alterata	59	21,57 \pm 7,75	
Sclerosi			
Presente	44	21,28 \pm 8,11	0,035
Assente	445	23,83 \pm 7,61	
Atrofia			
Presente	15	21,47 \pm 80,07	>0,05
Assente	474	23,67 \pm 7,67	
Linfonodi sopramammari			
Normali	270	23,84 \pm 7,77	>0,05
Ipertrfici	219	23,30 \pm 7,59	
Lupie			
Presenti	59	22,70 \pm 7,13	>0,05
Assenti	430	23,72 \pm 7,75	
Esame batteriologico			
Positivo	38	23,37 \pm 7,96	0,008
Negativo	446	23,80 \pm 7,60	

I risultati evidenziano un valore medio del VOS significativamente più basso ($p < 0,05$) nei soggetti con consistenza alterata della mammella e con sclerosi (mammella destra), e nei soggetti con esame batteriologico positivo. Negli altri parametri i valori del VOS non hanno mostrato variazioni statisticamente significative.

DISCUSSIONE

In generale nel nostro gregge campione, lo status sanitario degli animali era ottimo. Non abbiamo cioè rilevato molti casi di lesioni mammarie, sia acute che croniche, dato confortato dagli esami microbiologici del latte che non hanno mai mostrato presenze preoccupanti di agenti patogeni. Il risultato è probabilmente accentuato anche dalla fascia di età degli animali selezionati per effettuare i rilievi (giovani al secondo parto) normalmente poco indicata per evidenziare lesioni mammarie di una certa importanza. Le ottime condizioni sanitarie del gregge quindi, non ci hanno fornito un numero sufficientemente grande di animali con batteriologici del latte positivi e/o con lesioni mammarie numerose e clinicamente apprezzabili. Nonostante ciò, abbiamo comunque ottenuto dei risultati interessanti. Uno di questi riguarda la relazione individuata tra il VOS e una consistenza

alterata della mammella alla palpazione, in particolare al rilievo del segno di sclerosi. La sclerosi è un segno clinico legato a fenomeni di cicatrizzazione e cronicizzazione conseguente a mastiti. Potremo definirla una alterazione patologica della mammella che comporta una perdita di elasticità dei tessuti connettivi. Nella pratica clinica si apprezza in particolare sulla parete della cisterna mammaria ed è dovuta alla progressiva fibrosi conseguente ai processi riparativi. E' un sintomo non patognomiconico di riscontro relativamente comune. La sua presenza è generalmente conseguenza dell'infezione batterica ma può anche essere rilevata in assenza di positività agli esami microbiologici del latte (per esempio dopo guarigione, sia spontanea che a seguito di una terapia). Il valore di VOS significativamente inferiore negli animali con sclerosi rafforza l'ipotesi che uno sfintere che si apre e chiude più facilmente, probabilmente più lasso, predisponga maggiormente gli animali al rischio infezione. L'ipotesi è ulteriormente rafforzata dal valore di VOS leggermente ma significativamente più basso negli animali con batteriologico positivo. Purtroppo nel nostro campione il riscontro di alcuni segni clinici è stato così ridotto da non consentire elaborazioni statistiche che potessero fornire risposte attendibili su aspetti delle mastiti in altri casi comuni nelle visite di greggi infetti. Riteniamo che la tecnica di valutazione del VOS sia estremamente interessante e che possa consentire la precoce individuazione nel gregge di capi a rischio, maggiormente predisposti alla possibile risalita di germi patogeni tramite il capezzolo, tuttavia crediamo che questi primi riscontri necessitino di nuove prove, da condurre in particolare su greggi affette da diffusi problemi di mastiti batteriche. In queste condizione dovrebbe essere più facile verificare ed eventualmente confermare correlazioni fra segni clinici e capacità di resistenza dello sfintere del capezzolo alla chiusura. Concludiamo ricordando che la resistenza all'apertura del capezzolo potrebbe essere un carattere ereditario e di conseguenza aprire interessanti prospettive nell'ottica della selezione e del miglioramento genetico delle pecore da latte.

BIBLIOGRAFIA

- Boettcher PJ, Dekkers JC, Kolstad BW. - Development of an udder health index for sire selection based on somatic cell score, udder conformation, and milking speed. J Dairy Sci. 1998 Apr;81(4):1157-68.
- Rupp R, Boichard D. - Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell score, production, udder type traits, and milking ease in first lactation Holsteins. J Dairy Sci. 1999 Oct;82(10):2198-204.
- Samoré AB, Román-Ponce SI, Vacirca F, Frigo E, Canavesi F, Bagnato A, Maltecca C. Bimodality and the genetics of milk flow traits in the Italian Holstein-Friesian breed. J Dairy Sci. 2011 Aug;94(8):4081-9.
- Grindal RJ, Walton AW, Hillerton JE. - Influence of milk flow rate and streak canal length on new intramammary infection in dairy cows. J Dairy Res. 1991 Nov;58(4):383-8.
- Marnet, P.G., Combaud, J.F., Dano, Y., 1999. Relationships between characteristics of the teat and milkability in Lacaune ewes. In: Proceedings of the Sixth International Symposium on Milking of Small Ruminants, Athens, Greece, September 26–October 1, 1999. EAAP Publication no. 95, pp. 41–44.
- Casu, 2004 - Recherche de QTL contrôlant la cinétique de l'émission du lait et la morphologie de la mamelle chez les brebis laitières. Ph.D. Thesis. Institut National Agronomique Paris-Grignon, p. 292.
- Marogna G., Rolesu S., Lollai S., Tola S., Leori S.G. - Clinical findings in sheep farms affected by recurrent bacterial mastitis. - Small Ruminant Research - 88 (2010) 119-125.

DETERMINAZIONE RAPIDA CON METODO BIOMOLECOLARE DI BATTERI LATTICI DA LATTE E DERIVATI - RISULTATI PRELIMINARI -

Marri N., Carfora V., Patriarca D., Pietrini P., Filippetti F., Giangolini G., Amatiste S.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

Key words: lactic acid bacteria, PCR, dairy products

ABSTRACT

Polymerase chain reaction (PCR) assays were applied for fast and easy identification of some species and subspecies of lactic acid bacteria in milk, thermised milk, curd, cheese, ricotta cheese and yogurt.

INTRODUZIONE

I batteri lattici, rappresentano un gruppo eterogeneo di microrganismi cocchi o bacilli Gram +, catalasi -, microaerofili o anaerobi, appartenenti a numerose specie differenti in grado di produrre acido lattico attraverso vie metaboliche omo ed eterofermentanti (3). I processi enzimatici e di acidificazione, che accompagnano la crescita dei batteri lattici, conferiscono particolari aromi e caratteristiche ad un'ampia varietà di prodotti fermentati come i derivati del latte, della carne e dei vegetali, inoltre tali batteri svolgono un importante ruolo nel controllo della crescita di microrganismi indesiderati (6). Nel latte crudo e nei prodotti lattiero-caseari quali formaggi, yogurt e latte fermentato, i batteri lattici appartenenti soprattutto al genere *Lactobacillus* possono essere naturalmente presenti o aggiunti intenzionalmente (colture starters) per ragioni tecnologiche o per apportare eventuali benefici alla salute del consumatore (3). Considerate le complesse interazioni microbiche che si verificano durante il processo di coagulazione del latte e di maturazione dei formaggi, un'accurata identificazione dei microrganismi coinvolti consente di ottenere informazioni essenziali per comprendere il loro ruolo in questi processi al fine di poter fornire criteri più oggettivi per la selezione dei ceppi batterici utilizzati come starters o colture aggiunte (6). Attraverso lo studio della popolazione batterica naturalmente presente, la caratterizzazione dei prodotti lattiero caseari potrebbe prevenire la perdita di una biodiversità microbica nei prodotti tipici e tradizionali e la conseguente perdita della produzione di una vasta gamma di prodotti lattiero-caseari ottenuti con diversi metodi, le cui caratteristiche intrinseche dipendono direttamente dalle tradizioni regionali e locali e dalla popolazione microbica autoctona presente nel latte crudo e selezionata dall'ambiente di lavorazione del prodotto (4). L'identificazione dei batteri lattici basata sull'analisi delle caratteristiche fenotipiche si è dimostrata spesso lunga e difficoltosa per diverse ragioni. Innanzitutto, la valutazione dell'aspetto morfologico delle colonie cresciute sui terreni di coltura specifici attualmente in uso non consente di effettuare un'analisi completa e realmente discriminante di tutta la popolazione microbica presente in quanto colonie batteriche appartenenti a specie differenti possono mostrare un aspetto molto simile, viceversa colonie appartenenti alla stessa specie batterica possono apparire morfologicamente differenti; a tal proposito i passaggi di purificazione delle colonie e la successiva tipizzazione biochimica possono risultare non sempre esaustivi. È inoltre opportuno considerare la presenza di una grande variabilità dei profili di fermentazione dei microrganismi che differiscono considerevolmente anche per ceppi batterici appartenenti alla stessa specie (6) come

anche le esigenze nutrizionali e di crescita poco selettive per le diverse specie (4). Negli ultimi anni lo sviluppo di tecniche biomolecolari ha aperto nuove prospettive per la caratterizzazione dei batteri lattici, consentendo di distinguere specie microbiche fenotipicamente simili ma anche di individuare ceppi batterici appartenenti alla stessa specie (6). Scopo del presente lavoro, è lo sviluppo di un metodo biomolecolare, in via di validazione, per l'identificazione rapida di alcune delle specie e sottospecie di batteri lattici presenti nel latte e in derivati del latte di origine bovina, bufalina e ovi-caprina.

MATERIALI E METODI

Da Gennaio a Luglio 2011 sono stati analizzati 11 campioni di latte crudo, 4 di latte termizzato e diverse tipologie di prodotti lattiero-caseari provenienti da aziende localizzate nella regione Lazio: 5 cagliate, 17 formaggi (freschi, stagionati e a pasta filata), 2 ricotte, 7 yogurt bianchi e 4 yogurt alla frutta per un totale di 50 campioni. Di questi, 11 campioni appartenenti alla specie bovina, 16 di origine bufalina, 20 ovi-caprini e 3 di tipologia mista. Una volta prelevati, sono stati conservati ad una temperatura di 4°C e sottoposti alle analisi di laboratorio entro 24 ore dal loro arrivo. Sono state allestite diluizioni 1:10 in acqua peptonata dalle matrici liquide e da quelle solide, da cui sono state effettuate delle subcolture trasferendo 1 ml della diluizione 1:10 in 9 ml di M17 broth e MRS broth (De Man, Rogosa and Sharpe broth) utilizzati rispettivamente per la ricerca di lattococchi e lattobacilli. Dopo incubazione di 24-48 ore a 37°C in aerobiosi per le brodocolture di M17 broth e in anaerobiosi per le brodocolture di MRS broth, il DNA è stato estratto nel modo seguente: 1 ml di ogni brodocoltura è stato centrifugato a 7500 rpm per 10 minuti, dopo aver eliminato il surnatante il pellet è stato risospeso in 1 ml di acqua distillata sterile e nuovamente centrifugato. Dopo aver eliminato il surnatante, si è proseguito all'estrazione del DNA genomico a partire dal pellet batterico utilizzando il kit di estrazione Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Il DNA così ottenuto è stato sottoposto ad analisi in PCR, utilizzando i primers e le condizioni di reazione riportati in letteratura per l'identificazione di *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (4), *Streptococcus thermophilus* (4), *Enterococcus faecalis* (6), *Lactobacillus plantarum* (6), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (7), *Lactobacillus helveticus* (5) e, solo per i campioni di origine bufalina, *Lactobacillus paracasei* (4). Per ogni reazione di PCR è stato utilizzato come controllo positivo il DNA appartenente a ceppi batterici di riferimento certificati (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) e il DNA di ceppi batterici appartenente ad una collezione fornita dall'Istituto Superiore di Sanità. Gli amplificati, ottenuti tramite l'utilizzo di GeneAmp®PCR System 9700 (Applied Biosystems), sono stati esaminati tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio al 1,2% contenente Gel Red in tampone Tris-acetato-EDTA 1X e visualizzati con transilluminatore.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I batteri lattici identificati tramite PCR, correlati alla tipologia di matrice e alla specie animale di provenienza, sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1 –Batteri lattici identificati tramite PCR

Matrice	Specie animale	Batteri lattici identificati tramite PCR
Latte crudo	bovina	<i>Lb. plantarum</i> ; <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ; <i>E. faecalis</i> ; <i>S. thermophilus</i>
	bufalina	<i>Lb. paracasei</i> ; <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ; <i>Lb. helveticus</i> ; <i>Lb. plantarum</i> ; <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ; <i>E. faecalis</i>
Latte termizzato	bufalina	<i>Lb. paracasei</i> ; <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ; <i>Lb. helveticus</i> ; <i>Lb. plantarum</i> ; <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ; <i>E. faecalis</i> ; <i>S. thermophilus</i>
Cagliata	bufalina	<i>Lb. paracasei</i> ; <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ; <i>Lb. helveticus</i> ; <i>Lb. plantarum</i> ; <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ; <i>S. thermophilus</i> ; <i>E. faecalis</i>
Formaggio	bufalina	<i>Lb. paracasei</i> ; <i>Lb. helveticus</i> ; <i>Lb. plantarum</i> ; <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ; <i>Str. thermophilus</i> ; <i>E. faecalis</i>
	bovina	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ; <i>Lc. Lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ; <i>S. thermophilus</i>
	ovina	<i>Lb. plantarum</i> ; <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ; <i>E. faecalis</i> ; <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
	caprina	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ; <i>Lb. plantarum</i> ; <i>S. thermophilus</i> ; <i>E. faecalis</i>
	mista	<i>Lb. plantarum</i> ; <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ; <i>S. thermophilus</i>
Ricotta	caprina	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ; <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ; <i>Lb. plantarum</i> ; <i>S. thermophilus</i>
Yogurt	bovina	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ; <i>S. thermophilus</i>
	caprina	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ; <i>Lb. plantarum</i> ; <i>S. thermophilus</i>

I dati preliminari mostrano come questo metodo biomolecolare (in corso di validazione) applicato alle diverse tipologie di matrici lattiero-casearie finora analizzate, risulti efficace per l'identificazione delle specie e delle sottospecie di batteri lattici sopracitate. Tale metodica sembra consentire un'efficace identificazione della flora lattica in esame in tempi brevi e con maggiore facilità rispetto ai tradizionali metodi di identificazione fenotipica. Tale affermazione dovrà essere supportata dall'esecuzione di ulteriori prove analitiche al fine di completare la validazione del metodo e dallo sviluppo di nuove tecniche biomolecolari per l'identificazione di altre specie e sottospecie microbiche, per ampliare la caratterizzazione del numero di specie di batteri lattici presente nei prodotti in esame. Consapevoli dell'esistenza di altri metodi biomolecolari a disposizione per lo stesso scopo, tra cui la PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) (2), le tecniche ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis) (1) e RAPD (random amplified polymorphic DNA) (7), si ritiene che l'applicazione della PCR tradizionale costituisca uno strumento molto utile e affidabile per lo studio della flora lattica dei prodotti lattiero-caseari.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Aquilanti L., Silvestri G., Zannini E., Osimani A., Santarelli S., Clementi F. Phenotypic, genotypic and technological characterization of predominant lactic acid bacteria in Pecorino cheese from central Italy. 2007. Journal of Applied Microbiology **103**. 948–960
- 2) Bonetta S., Bonetta S., Carraro E., Rantsiou K., Coccolin L., 2008. Microbiological characterisation of Robiola di Roccaverano cheese using PCR– DGGE. Food Microbiology **25**. 786– 792.
- 3) Coeuret V., Dubernet S., Bernardeau M., Gueguen M., Vernoux J., 2003. Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. Lait **83**. 269–306.
- 4) Fortina G.M., Ricci G., Acquati A., Zeppa G., Gandini A., Manichini P.L., 2003. Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. Food Microbiology **20**, 397–404 .
- 5) Fortina G.M., Ricci G., Mora D., Parini C., Manichini P.L., 2001. Specific identification of *Lactobacillus helveticus* by PCR with *pepC*, *pepN* and *htrA* targeted primers. FEMS Microbiology Letters. **198**, 85–89.
- 6) Martín-Platero A.M., Valdivia E., Maqueda M., Martín-Sánchez I., and Martínez-Bueno M., 2008. Polyphasic Approach to Bacterial Dynamics during the Ripening of Spanish Farmhouse Cheese, Using Culture-Dependent and -Independent Methods. Applied And Environmental Microbiology, **74**, 5662–5673.
- 7) Torriani S., Zapparoli G., Dellaglio F., Use of PCR-Based Methods for Rapid Differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *Lactis* .Applied and Environmental Microbiology, 1999, p. 4351–4356.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia la Dott.ssa Anna Maria Ferrini del Reparto Microrganismi e Tecnologie Alimentari, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, per i materiali di riferimento forniti.

STUDIO DELLE REAZIONI SIEROLOGICHE CROCIATE NELLA DIAGNOSI DI BRUCELLOSI BUFALINA: CONFRONTO TRA BUFALI ESPOSTI A *YERSINIA ENTEROCOLITICA* O:9 E *BRUCELLA ABORTUS* S19.

¹ Martucciello A., ¹De Carlo E., ¹Schiavo L., ¹De Donato I., ¹Viscito A., ³Parente G., ²Guarino A.

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno-Centro di Referenza Nazionale sull'Igiene e le Tecnologie dell'Allevamento e delle Produzioni bufaline-Sezione Diagnostica Provinciale di Salerno;

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno-Portici

³ASL Salerno, ambito Salerno 2, DS 64, Eboli

Key words: brucellosi, bufalo, cross-reattività.

ABSTRACT

In this study thirteen buffaloes - three calves vaccinated with *Yersinia enterocolitica* O:9 and ten heifers vaccinated with *Brucella abortus* S19 - were evaluated. All samples were tested with Rose Bengal Test (RBT), Complement Fixation Test (CFT), Fluorescence Polarization Assay (FPA), competitive ELISA (cELISA), indirect ELISA (iELISA) and ELISA using *Yersinia* Outer membrane Proteins (YOPs). Sera from *Brucella abortus* S19 vaccinated group reacted positively in the RBT, FPA, CFT, iELISA tests. Sera from *Y. enterocolitica* O:9 vaccinated group reacted positively in the RBT, FPA, ELISA-YOPs tests and did not react in the iELISA and cELISA tests; one of them gave a low positive reaction in the CFT test. In a field study, 32% of 56 serum samples presenting suspect serological reaction, showed anti-YOPs antibodies. Our results suggest that infections with *Y. enterocolitica* O:9 may cause false positive reactions in brucellosis testing in buffaloes.

INTRODUZIONE

Le prove sierologiche per la diagnosi di brucellosi previste dalla normativa vigente (1,2), sono rappresentate dalle reazioni di siero-agglutinazione rapida con antigene rosa bengala (SAR) e di fissazione del complemento (FdC), prove che evidenziano principalmente anticorpi anti-LPS. Nonostante tali prove siano molto sensibili nell'evidenziare la presenza nell'allevamento dell'agente eziologico, sono state accertate reazioni sierologiche false positive in animali esposti a batteri Gram negativi con LPS simili a quelli di *Brucella* (5,7). Tra questi batteri *Yersinia enterocolitica* O:9 induce alti livelli di anticorpi anti-LPS di *Brucella* spp., in quanto produttore della stessa porzione antigenica. Tale risposta è generalmente temporanea nei bovini (9).

La virulenza di *Yersinia enterocolitica* è associata alla presenza di un plasmide specifico che codifica una proteina definita YOPs (*Yersinia* outer membrane Proteins). La presenza di anticorpi specifici per *Yersinia enterocolitica* viene evidenziata attraverso l'impiego di un kit Elisa con antigeni YOPs.

Negli ultimi anni presso i laboratori di sierologia dell'IZSM è stato osservato un aumento delle reazioni sierologiche positive negli allevamenti bufalini storicamente Ufficialmente Indenni e nei quali non si è mai giunti ad una conferma batteriologica.

MATERIALI E METODI

Sieri

La sperimentazione ha avuto luogo in due aziende zootecniche bufaline ufficialmente indenni da brucellosi. Nella prima (azienda A), n. 4 vitelli maschi sono stati sottoposti ad una preliminare indagine sierologica e microbiologica al fine di escludere la presenza di *Brucella* spp. o di *Yersinia* spp. Tre vitelli sono stati inoculati per s.c. con antigene *Y. enterocolitica* O:9 alla dose di 5×10^9 Unità Formanti Colonie (UFC) con richiamo dopo 15 giorni

alla dose di 10×10^9 UFC. Un quarto vitello è stato utilizzato come controllo negativo. Nella seconda azienda (azienda B) sono stati individuati random 10 animali, anch'essi sottoposti alla preliminare indagine sierologica e microbiologica. Gli animali scelti sono stati inoculati con ceppo vaccinale (CZV S-19 Fatro) somministrato alla dose di 1×10 UFC con richiamo dopo 90 giorni alla dose di 1×10^{10} UFC per via oculo-congiuntivale.

Entrambi i gruppi sono stati sottoposti, i primi con cadenza settimanale per nove settimane e i secondi con cadenza mensile per cinque mesi, a prelievo ematico per l'esecuzione delle prove sierologiche SAR, FdC, ELISA indiretta (i-ELISA), ELISA a competizione (c-ELISA), tecnica a fluorescenza polarizzata (FPA), YOPs-ELISA e a prelievo di feci per ricerca batterica di *Yersinia* spp., *E.coli* verocitotossici, *Salmonella* spp, ed esame parassitologico. A fine sperimentazione gli animali sono stati sottoposti a macellazione e gli organi sono stati prelevati per ricerca *Brucella* spp.

Inoltre, 56 sieri di bufali provenienti da aziende Ufficialmente Indenni risultati dubbi (SAR positivi ed FdC negativi), sono stati collezionati e sottoposti alle prove sierologiche.

Tests sierologici e batteriologici

La SAR e l'FdC sono state utilizzate in accordo con quanto indicato dalla legislazione vigente. Per l'esecuzione di iELISA (Institut Pourquier ELISA Brucellosis, Francia), cELISA (Svanova Biotech AB, Sweden), FPA (Prionics, Italia) sono state seguite le indicazioni delle case produttrici. Il kit Elisa YOPs (Labor Diagnostik Leipzig, Germania) è stato integrato con coniugato anti-bufalo e tarato sulla specie bufalina. Le analisi batteriologiche sono state eseguite secondo quanto descritto da Quinn et al. (8).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Tutti gli animali oggetto della sperimentazione sono risultati sempre negativi alla ricerca microbiologica di *Yersinia* spp., *E. coli* verocitotossici, *Salmonella* spp. da feci e a quella di *Brucella* spp. da organi a fine sperimentazione.

Il soggetto controllo si è mantenuto sempre negativo alle prove sierologiche volte ad evidenziare la presenza di anticorpi anti *Brucella* e anti *Yersinia*.

I risultati ottenuti (tabb. 1 e 2) evidenziano che nel bufalo, come descritto già nel bovino (3), *Y. enterocolitica* O:9 induce titolo anticorpale persistente nel tempo. La SAR risulta essere la prova meno specifica: tutti gli animali inoculati con *Yersinia* hanno sviluppato anticorpi evidenziabili con questa tecnica. D'altra parte l'FdC, considerato universalmente un test molto specifico, classifica uno degli animali oggetto della sperimentazione come positivo (20 UI/ml) a *Brucella*, anche se per un periodo di tempo limitato. Ciò suggerisce che la specificità dell'FdC è discutibile in una popolazione di animali in cui è presente *Y. enterocolitica*. ELISA indiretta e competitiva hanno dato sempre esito negativo risultando pertanto le tecniche più specifiche in questo caso.

L'FPA eseguita su specie bufalina è una tecnica sensibile (4), ma di scarsa specificità (6). Ciò è confermato anche dai dati ottenuti nel nostro studio.

Anticorpi anti YOPs sono evidenziabili nei sieri degli animali vaccinati con *Y. enterocolitica* O:9, ma non nei sieri degli animali inoculati con *B. abortus* S19.

Dei 56 sieri bufalini collezionati risultati dubbi, 18 (32%) presentavano anticorpi anti *Yersinia* (tab. 3). Ciò suggerisce che *Y. enterocolitica* O:9 può determinare reazioni false positive anche nella specie bufalina, ma non rappresenta l'unica fonte di cross reattività.

I nostri risultati evidenziano chiaramente che con le tecniche sierologiche attualmente in uso non è possibile distinguere una cross reattività indotta da *Y. enterocolitica* O:9 da una vera reazione sierologica a *Brucella* spp. Pertanto, il test SAR può essere usato in un programma di screening a fronte del suo basso costo e della velocità di esecuzione, ma altri tests o combinazioni di tests devono essere usati per una diagnosi certa, oltre ad un'accurata indagine epidemiologica atta ad identificare i fattori di rischio come l'età degli animali, le movimentazioni, la posizione e la dimensione dell'azienda così come l'effetto stagionale.

BIBLIOGRAFIA

- Decreto del Ministero della Sanità 2 luglio 1992. no.453. Regolamento concernente il piano nazionale per la eradicazione della brucellosi negli allevamenti ovini e caprini. G.U.R.I. 23.11.1992, no.276.
- Decreto Ministeriale 27 agosto 1994, no.651. Regolamento concernente il piano nazionale per la eradicazione della brucellosi negli allevamenti bovini. G.U.R.I. 26.11.1994, no.277.

- Godfroid J., Saegerman C., Wellemans V., Walravens K., Letesson J.J., Tibor A., Mc Millan A., Spencer S., Sanna M., Bakker D., Pouillot R., Garin-Bastuji B. (2002). How to substantiate eradication of bovine brucellosis when aspecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. Vet. Microbiol. 90:461-477.

- Montagnaro S., Longo M., Mallardo K., Pisanelli G., De Martino L., Fusco G., Baldi L., Pagnini U., Iovane G. (2008). Evaluation of a fluorescence polarization assay for detection of serum antibodies

to *Brucella abortus* in water buffalo (*Bubalus bubalis*). Vet. Immunol. and Immunopathol. 125: 135-142.

- Muñoz P.M., Marín C.M., Monreal D., González D., Garin-Bastuji B., Díaz R., Mainar-Jaime R.C., Moriyón I., Blasco J.M. (2005) Efficacy of Several Serological Tests and Antigens for Diagnosis of Bovine Brucellosis in the Presence of False-Positive Serological Results Due to *Yersinia enterocolitica* O:9. Clin Diagn. Lab. Immunol., vol.12, No.1: 141-151.

- Nicoletti P. (1992) An evaluation of serologic tests used to diagnose brucellosis in buffaloes (*Bubalus bubalis*). Trop. Anim. Health Prod. 24(1):40-44.

- Nielsen K., Smith P., Widdison J., Gall D., Kelly L., Kelly W., Nicoletti P. (2004) serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. Vet. Microbiol., 100:25-30.

- Quinn P.J., Carter M.E., Markey B., Carter G.R. (1994). Clinical Veterinary Microbiology. Mosby-Year Book, London.

- Weynants V., Tibor A., Denoel P.A., Saegerman C., Godfroid J., Thiange P., Letesson J.J. (1996) Infection of cattle with *Yersinia enterocolitica* O:9 a causa of the false positive serological reactions in bovine brucellosis tests. Vet. Microbiol., 48:101-112.

Tabella 1.
Risultati relativi alla sperimentazione condotta nella azienda A (D= risultato dubbio-P=risultato positivo)
S=Settimana

Esami	gg 0 5 x 10 ⁹ UFC	S 1	S 2 10 x 10 ⁹ UFC	S 3	S 4	S 5	S 6	S 7	S 8	S 9
SAR	0	0	3 P	3 P	2 P	2 P	2 P	2 P	2 P	2 P
FdC	0	0	0	0	0	0	1 P	1 P	1 P	0
iELISA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
cELISA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FPA	0	0	2 P	1P 2D	1P 2D	1P 2D	1P 1D	1P 1D	1P 1D	1P 1D
ELISA	0	0	2P	2P	2P	2P	2P	1P	1P	1P
YOPs										

Tabella 2.
Risultati relativi alla sperimentazione condotta nella azienda B (D= risultato dubbio-P=risultato positivo)

Esami	gg 0 1 x 10 ¹⁰ UFC	Mese 1	Mese 2	Mese 3 1 x 10 ¹⁰ UFC	Mese 4	Mese 5
SAR	0	0	3P	2P	8P	7P
FdC	0	0	0	1P	6P	3P
iELISA	0	0	0	0	1P 3D	1P 3D
cELISA	0	0	0	0	0	0
FPA	0	0	0	1D	8P 2D	8P 1D
ELISA YOPs	0	0	0	0	0	0

Tabella 3.
Risultati relativi ai 56 sieri dubbi alle prove di profilassi (D= risultato dubbio-P=risultato positivo)

Specie	Tot dubbi	SAR	FdC	i-Elisa	c-Elisa	FPA	Elisa YOPs
bufalina	56	56P	0	7P 1D 14.3%	5P 8.9%	21P 53.6% 9D	18P 32%

APPLICAZIONE DI UN METODO PER L'IDENTIFICAZIONE DELLA PATATA AMFLORA (EH92-527-1) CON L'UTILIZZO DELLA PCR REAL TIME

Mascia L., Vodret B., Mancuso M. R., Serratrice G., Oggiano M. A., Marongiu E.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna

Key words: Amflora, food and feed, real-time PCR

ABSTRACT

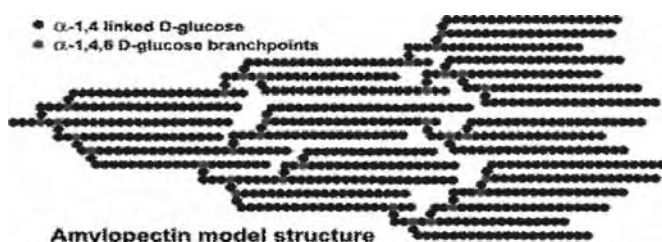
Amflora (EH92-527-1) is a genetically modified potato variety, by the chemical company BASF. While potatoes naturally produce a mixture of amylose and amylopectin, this variety produces only amylopectin. For this reason the Amflora is not well suited for human consumption, and it is solely grown for industrial applications. However it is still possible the adventitious or technically unavoidable presence of the Amflora in food and other feed products. In this context, the aim of this study was to evaluate the presence of transgenic DNA in processed potatoes.

INTRODUZIONE

Dal 1996 ad oggi, le coltivazioni di piante transgeniche nel mondo hanno subito una considerevole espansione. Infatti in quell'anno in Europa si è avuta l'autorizzazione del primo mais e soia OGM e con il procedere degli anni c'è stato un progressivo incremento di OGM autorizzati, sino a raggiungerne un totale di 45, tra eventi singoli e stacked, interessando diverse specie vegetali come cotone, colza, lino, barbabietola da zucchero e patata.

In particolare una patata geneticamente modificata è l'Amflora (EH92-527-1). L'Amflora, derivata dalla "Cultivar Prevalent", è stata modificata per la produzione di amilopectina pura (Figura n.1).

Figura n. 1. Struttura dell'amilopectina



Infatti, l'amido normalmente presente nella patata, è composto al 20% da amilosio ed all'80% da amilopectina. Entrambe le molecole sono polimeri del glucosio, con la differenza che l'amilosio forma catene lineari mentre l'amilopectina ha una struttura ramificata.

Nella patata EH92-527-1 la produzione di amilosio è stata praticamente azzerata grazie all'introduzione di una copia invertita del gene codificante per l'enzima, già presente nelle specie attuali, che regola la sintesi dell'amilosio. Questa forma "ribaltata" non funzionante del gene impedisce al vegetale di sintetizzare l'amilosio e garantisce l'aumento del rapporto amilopectina/amilosio.

Il 2 Marzo 2010 la Commissione Europea ha autorizzato l'immissione in commercio, della patata Amflora, il cui nome tecnico è: *Solanum tuberosum* L. linea EH92-527-1. In particolare, con la Dec. n. 2010/135/UE, la coltivazione di "Amflora" per fini industriali è stata autorizzata in tutta l'UE

(1), mentre la Dec. n. 2010/136/UE ha regolamentato l'utilizzo di mangimi ottenuti dalla patata "Amflora" e la sua presenza accidentale o tecnicamente inevitabile nei prodotti alimentari e in altri mangimi (2). Infatti l'Amflora non è destinata al diretto consumo umano a causa della maggior presenza di amilopectina, che la rende quindi particolarmente adatta solo all'impiego industriale.

L'immissione in commercio di "Amflora", come per gli altri OGM autorizzati (3), è corredata da una serie di precauzioni necessarie a tutelare i consumatori, come ad esempio le dichiarazioni obbligatorie. L'etichettatura dei mangimi ottenuti dalla patata Amflora dovrà recare la dicitura "questo prodotto contiene OGM" oppure "questo prodotto contiene patate geneticamente modificate EH92-527-1", unitamente alla dicitura "non destinato al consumo umano".

L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna fa parte dei Laboratori deputati al controllo ufficiale degli OGM. L'obiettivo di questa ricerca è di monitorare l'eventuale presenza, accidentale o tecnicamente inevitabile della patata Amflora, in prodotti alimentari e in mangimi commercializzati nel nostro territorio.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati n. 30 campioni, di cui 20 prodotti alimentari e 10 mangimi, e due materiali di riferimento certificati della ditta Fluka, derivanti da farina di patata 100% e 0% OGM (gli unici due materiali di riferimento presenti in commercio), utilizzati rispettivamente come controllo positivo e negativo.

La prima fase del lavoro è stata incentrata sull'estrazione di una matrice alimentare di riferimento quale la patata sarda di campo sottoposta a tre diverse preparazioni: bollita, arrosto e frita (Figura n.2).

Figura n. 2



Questo passaggio è stato reputato necessario per verificare l'applicabilità dei metodi di estrazione sulla matrice tal quale e trattata, prima di passare alla seconda fase del lavoro, quale sottoporre ad analisi i rimanenti campioni complessi provenienti da diversi supermercati e rivendite di Sassari.

Tutti i campioni sono stati omogeneizzati con un omogeneizzatore a lame. Il DNA è stato estratto utilizzando due differenti tecniche di estrazione: metodo A (estrazione con CTAB integrato con lo step della purificazione mediante mini colonne Wizard, Promega) (4); metodo B (kit commerciale "DNeasy mericon Food Kit" della QIAGEN) (5). Per il kit commerciale è stato utilizzato il protocollo fornito

dall'azienda produttrice.

Per verificare la qualità del DNA estratto è stata eseguita la valutazione spettrofotometrica di tutti gli estratti. Il DNA estratto è stato quindi utilizzato per le prove di amplificazione di PCR real-time.

Al fine di verificare l'amplificazione del DNA, è stato necessario ricercare i geni endogeni, sicuramente presenti nei campioni analizzati. Per questo motivo abbiamo utilizzato primer universali per il cloroplasto. Successivamente abbiamo ricercato quelli specifici per la patata, utilizzando il programma di amplificazione e la miscela di reazione del CRL (6). Una volta accertata la presenza dell'endogeno, sul DNA estratto è stata ricercata l'evento transgenico (6).

RISULTATI

I risultati ottenuti dalla valutazione spettrofotometrica, hanno evidenziato la bontà di entrambi i metodi di estrazione del DNA (buoni rapporti A_{260}/A_{280}) sia per le matrici alimentari di riferimento (Tabella 1), sia per le due classi di matrici complesse, alimenti e mangimi come riportato rispettivamente nella Tabella 2 e nella Tabella 3.

Tabella 1: Risultati della qualità del DNA ottenuti sulle matrici alimentari di riferimento sottoposte alle due diverse estrazioni (rapporti A_{260}/A_{280})

Campione	Risultato (A_{260}/A_{280})	
	Metodo A	Metodo B
Patata cruda	2.0	1.9
Patata bollita	1.9	1.8
Patata arrosto	1.8	1.9
Patata fritta	1.9	1.9

Per ogni campione si riporta la media di sei determinazioni

Tabella 2: Risultati della qualità del DNA ottenuti sulle matrici complesse ad uso umano sottoposte alle due diverse estrazioni (rapporti A_{260}/A_{280})

Campione	Numero alimenti analizzati	Risultato (A_{260}/A_{280})	
		Metodo A	Metodo B
Farina semplice e/o mista	4	1.9	1.8
Passati	2	1.7	1.6
Pane	4	1.8	1.8
Pasta	3	1.8	1.7
Prodotto salato da forno	3	1.9	1.8
Snack salati	4	1.9	1.8

Per ogni campione si riporta la media delle determinazioni effettuate per tipologia

Tabella 3: Risultati della qualità del DNA ottenuti sulle matrici complesse ad uso zootecnico sottoposte alle due diverse estrazioni (rapporti A_{260}/A_{280})

Campione	Numero mangimi analizzati	Risultato (A_{260}/A_{280})	
		Metodo A	Metodo B
Mangimi per cani	4	1.8	1.7
Mangimi per gatti	4	1.9	1.8
Pellet	2	1.8	1.8

Per ogni campione si riporta la media delle determinazioni effettuate per tipologia

Per quanto riguarda i risultati delle amplificazioni, il gene endogeno è stato riscontrato in tutti i campioni, che sono invece risultati negativi all'evento GM ricercato.

Inoltre, va evidenziata la buona performance di amplificazione ottenuta per tutte le sequenze analizzate.

DISCUSSIONE

I Regolamenti Europei stabiliscono l'obbligo di etichettatura per tutti i prodotti, alimenti e mangimi, che contengono OGM, con una soglia di tolleranza fissata allo 0,9% per gli OGM autorizzati e allo 0,5% per gli OGM in via di autorizzazione, già approvati dal Comitato Scientifico Europeo. Tale obbligo decade nel caso di presenza accidentale o tecnicamente inevitabile. Nel caso dell'Amflora commercializzata per usi industriali e non autorizzata per gli alimenti a uso umano, può essere accettata solamente una presenza accidentale con soglia di tolleranza inferiore allo 0,9%. Per verificare la corretta applicazione della legge, risulta di cruciale importanza la disponibilità di tecniche che consentano di identificare e quantificare in modo accurato e preciso la presenza di OGM, autorizzati e non. La metodologia utilizzata è la tecnica di PCR real-time: il punto critico per l'applicazione di questa tecnica è l'estrazione del DNA, poiché ciò influenza l'efficienza della reazione successiva e l'accuratezza dei risultati ottenuti. L'efficienza della PCR dipende infatti sia dalla qualità che dalla purezza del DNA estratto (scarsa degradazione, rapporto 260/280, libero da inibitori): le proteine, i polisaccaridi e i grassi presenti in matrici complesse possono talvolta inibire l'estrazione del DNA e i successivi protocolli di amplificazione.

Al fine del raggiungimento dell'obiettivo del nostro lavoro, verificare l'assenza di patata Amflora in prodotti alimentari e in mangimi commercializzati nel nostro territorio, l'estrazione del DNA è stata curata con molta attenzione, essendo questo uno dei punti cruciali di tutta l'analisi. A tal fine sono stati testati due differenti metodi di estrazione, su matrici semplici e complesse, risultati entrambi efficaci pur presentando alcune differenze. Riguardo la qualità del DNA estratto, dall'analisi dei nostri risultati, si evince che sia il metodo A, (CTAB seguito dalla purificazione con colonnine Wizard) che il metodo B, (kit commerciale "DNeasy mericon Food Kit" della QIAGEN) hanno dimostrato di poter estrarre DNA di alta qualità. Per quanto riguarda la resa, si attribuisce al metodo CTAB, un risultato leggermente inferiore, probabilmente dovuto alla perdita di DNA durante la separazione con cloroformio oppure alla bassa efficienza della precipitazione specifica. Tale perdita

è comunque compensata dalla buona qualità del DNA ottenuto e dal basso costo. Pertanto tale tecnica di estrazione potrebbe essere utilizzata nelle fasi successive del nostro lavoro. Per quanto riguarda i risultati del monitoraggio, pur considerando i nostri come preliminari, possiamo confermare al momento l'assenza di patata Amflora nei prodotti alimentari e nei mangimi da noi analizzati. Sarà necessario continuare il monitoraggio, sia su altre tipologie di campioni, sia effettuando prelievi in altre zone della Regione, al fine di garantire i consumatori sull'assenza dell'Amflora, anche come presenza accidentale o tecnicamente inevitabile, nella nostra isola.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Decisione 2010/135/UE relativa all'immissione in commercio di una patata (*Solanum Tuberosum* L. linea EH92-527-1) geneticamente modificata per aumentare il tenore di amilopectina nell'amido.
- 2) Decisione 2010/136/UE che autorizza l'immissione in commercio di mangimi ottenuti dalla patata geneticamente modificata EH92-527-1 (BPS-25271-9) e la presenza accidentale o tecnicamente inevitabile di tale patata in prodotti alimentari e in altri mangimi.
- 3) Regolamento (CE) N. 1829/2003 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 Settembre 2003 relativo agli alimenti e ai mangimi geneticamente modificati.
- 4) Milia M. et al.(2008) "Three different extraction methods for detecting Roundup Ready soybean in processed food from the Italian market " International Journal of Integrative Biology 3, 123-130.
- 5) DNeasy® mericon™ Food Handbook, Protocol QIAGEN.
- 6) GMO Detection Database Method, http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/pcr/QT_ST_001.pdf

SVILUPPO E VALIDAZIONE DI UN METODO DI CONFERMA PER DETERMINAZIONE DI AFLATOSSINA M1 NEL FORMAGGIO MEDIANTE HPLC-FLD

Massafra S., Gili M., Ferro G.L., Ostorero F., Olivo F., Abete M. C.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna 148, 10154 Torino
(marilena.gili@izsto.it)*

Key words: formaggio, aflatoossina M1, HPLC-FLD

ABSTRACT

A rapid and very effective HPLC-FLD procedure for the detection of AM1 in cheese was developed and tested. The method validation study was performed according to criteria defined by Decision 2002/657/EC for quantitative confirmatory methods. The following parameters were determined: linearity, specificity, LOD, LOQ, precision, recovery, ruggedness and stability. The proposed method is suitable for screening and confirmatory analysis.

INTRODUZIONE

L'aflatossina M1 (AM1) è il metabolita dell'aflatossina B1, prodotta da funghi *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, riscontrabile nel latte di bovini che hanno ingerito mangime contaminato. L'aflatossina M1 deve la sua sigla a "milk" (latte), in quanto passa, in quantità rilevanti, nel latte.

La ricerca dell'AM1 in latte e derivati rientra tra i controlli ufficiali effettuati dagli I.I.ZZ.SS., in quanto risulta tra i contaminanti più pericolosi per la salute umana.

Il Regolamento 2006/1881/EC stabilisce un limite massimo tollerato di 0,05 mg/Kg per il latte e di 0,025 mg/kg per il latte destinato alla prima infanzia, ma non fissa alcun limite nei formaggi.

Nel presente lavoro si descrive la procedura sviluppata e validata in accordo ai requisiti comunitari richiesti dal Reg. 2006/401/CE utilizzata per la determinazione quantitativa di AM1 mediante HPLC-FLD.

MATERIALI E METODI

TRATTAMENTO DELLA VETRERIA - La vetreria utilizzata viene precedentemente trattata con Acido Solforico 2M per evitare l'adsorbimento dell'analita sulla superficie del vetro.

PREPARAZIONE CAMPIONI - La procedura prevede l'estrazione di 10 g. di formaggio, con l'aggiunta di 5 g. di Terra Silicea, con 100 ml di diclorometano, mediante omogeneizzazione e agitazione in agitatore ad inversione e poi in bagno ad ultrasuoni. L'estratto è trasferito in pallone a cuore previa filtrazione su carta; il residuo è lavato con altri 30 ml di diclorometano e filtrato. Dopo evaporazione a 50°C e 400 mbar in evaporatore rotante, il residuo è ripreso con 1 ml di metanolo + 15 ml di acqua per 2 volte, trasferito in imbuto separatore e sgrassato con 50 ml di esano. Dopo raccolta della fase acquosa, si lava l'esano nell'imbuto separatore con 20 ml di acqua; si scarta la fase esanica e si riunisce la fase inferiore alla precedente. L'estratto grezzo è sottoposto a purificazione, mediante colonnine ad immunoaffinità. Dopo il caricamento del campione, le colonnine sono lavate con 50 ml di acqua; l'analita è eluito con 2 mL di miscela acetonitrile/metanolo (60/40 v/v). L'eluato, portato a secco a 50°C in corrente di azoto è ripreso con 100 mL di una soluzione di acetonitrile/metanolo (60/40 v/v) e 100 mL di acqua, filtrato su filtro a membrana da 0.2 µm, e utilizzato per l'analisi HPLC.

CONDIZIONI ANALITICHE - E' stato utilizzato un cromatografo HPLC Agilent serie 1200, con rivelatore FLD a 360 nm in

eccitazione e a 430 nm in emissione; colonna LICHROSHERE 60 RP SELECT B (250 x 4.6 mm, 5 mm) termostata a 35°C, secondo un programma di eluizione isocratica con fase mobile acqua/acetonitrile/metanolo (65/15/20 v/v/v), flusso di 1 mL/min e volume di iniezione di 20 mL.

STUDIO DI VALIDAZIONE - Il processo di validazione del metodo è stato condotto seguendo lo schema proposto nella "Linea Guida per la validazione intra-laboratorio di metodi di prova di conferma per la determinazione di sostanze di Categoria B" applicativa della Decisione 2002/657/EC⁽²⁾ della Rete I.I.ZZ.SS., valutando i seguenti indici di prestazione:

- **Linearità della risposta** - Valutata mediante la costruzione di una curva di taratura dai dati ottenuti iniettando 6 soluzioni standard in solvente, a livelli di concentrazione di 16, 31, 63, 125, 250, 500 pg iniettati, replicate tre volte. L'algoritmo utilizzato è stato quello dei minimi quadrati non pesati; della retta ottenuta si è verificato il coefficiente di determinazione, la distribuzione dei fattori di risposta y/x , la significatività dell'intercetta e il limite di rivelabilità.
- **Specificità** - Valutata su 23 campioni di formaggio di diverse tipologie (pasta dura, semidura, molle) verificando l'assenza di picchi significativi nell'intervallo $\Delta t = t_R \pm 2,5\%$ dei tempi di ritenzione degli standard nella stessa seduta.
- **Limiti analitici** - come previsto dal Reg. 2006/401/CE, sono stati valutati il limite di rivelazione (LOD) e il limite di quantificazione (LOQ), elaborando i dati di 23 campioni diversi di formaggio negativo.
- **Precisione** - sono stati fortificati campioni negativi, provenienti da un pool di formaggi, a 3 livelli di concentrazione in matrice (LOQ, 0,1 µg/Kg e 0,4 µg/Kg). Le prove sono state condotte in tre distinte sedute, effettuando 6 repliche per ogni livello. In ogni seduta è stata introdotta una curva in solvente per la valutazione del recupero. E' stato effettuato un test di analisi della varianza ad un fattore (ANOVA), da cui sono stati determinati i valori di s_r (ripetibilità) e S_r (riproducibilità intralaboratorio) per i singoli livelli. Il $Cv\%$ è stato verificato in accordo a Horwitz.
- E' stato calcolato anche il limite di decisione $CC\alpha$ al livello C_0

$$CC\alpha_{C_0} = C_0 + 1.64 S_{rC_0}$$

- **Recupero** - La valutazione del recupero medio per ogni livello è stata fatta mediante standardizzazione esterna con curva in solvente, secondo la relazione:

$$R\% = C_{\text{osservato}} (\mu\text{g/Kg}) / C_{\text{aggiunto}} (\mu\text{g/Kg}) \cdot 100.$$

Il recupero deve essere compreso tra 70-110%.

- **Robustezza** - E' stata verificata con l'approccio di Youden la robustezza ai cambiamenti minori, individuando 7 variabili potenzialmente critiche e gli intervalli di variazione introducendo variazioni < del 10% del valore nominale. Gli 8 esperimenti sono stati effettuati su un campione positivamente a 0.1 µg/Kg; le variabili considerate sono: tipologia colonne IAC,

volume lavaggio colonne IAC, volume eluizione campione, temperatura piastra riscaldata, temperatura centrifugazione, tempo centrifugazione, velocità centrifugazione.

- Stabilità degli estratti e delle soluzioni di lavoro – E' stata valutata la stabilità della soluzione madre di AM1 in acetonitrile, conservata a -20°C, e delle soluzioni di lavoro conservate a -20°C.
- Incertezza di misura – Stimata al livello del LOQ, utilizzando il metodo bottom up integrato proposto nella Linea Guida II.ZZ. SS., considerando un fattore di copertura $k=2$ e $n=2$, in quanto le prove di conferma prevedono l'esecuzione in doppio del campione.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Sviluppo metodo – Il metodo di analisi descritto è stato sviluppato dal laboratorio, non essendo disponibili metodi ufficiali per la ricerca di AM1 nel formaggio. Il metodo consente, attraverso una procedura semplice, di ottenere un efficace grado di purificazione del campione, come evidenziato in Figura 1c. Il rivelatore FLD utilizzato consente la quantificazione dell'analita a livelli di concentrazione idonei alle esigenze del cliente. Il metodo è in grado di identificare l'analita mediante lo spettro di emissione in fluorescenza già al più basso dei livelli di concentrazione considerati (0.040 mg/Kg).

Studio di validazione - Poiché il Regolamento 2004/882/EC impone ai laboratori che effettuano controlli ufficiali l'utilizzo di metodi validati allo scopo di verificarne l'idoneità agli scopi previsti, il metodo è stato sottoposto a validazione primaria in accordo al Regolamento 2006/401/EC, che richiede la verifica dei seguenti indici di prestazione: specificità, linearità della risposta strumentale, precisione, recupero, limiti analitici, robustezza, stabilità e incertezza di misura. I risultati ottenuti in fase di validazione sono riportati nella tabella 1.

Il metodo risulta altamente specifico, in quanto in tutti i campioni bianchi non si riscontrano segnali dovuti a interferenti di matrice, come evidenziato in Figura 1b: i cromatogrammi delle prove di specificità rilevano assenza di picchi significativi nell'intervallo $\Delta R_t = R_t \pm 2,5\%$ dei tempi di ritenzione dello standard nella stessa seduta.

La risposta strumentale risulta lineare nel range di concentrazione 0.8 – 25 ng/mL, corrispondenti a 0.015-0.500 mg/kg in matrice, con $R^2 = 0.9998$, fattori di risposta ai vari livelli compresi nell'intervallo $y/x_{medio} \pm 10\%$, intercetta non significativamente diversa da 0, limite di rilevabilità < primo punto di curva.

Sia il recupero che la precisione sono risultati conformi ai criteri di rendimento definiti dal Reg. 2006/401/CE.

Lo studio di robustezza non ha evidenziato la presenza di variabili critiche tra quelle considerate.

La soluzione madre e la soluzione di drogaggio sono stabili per un periodo non inferiore a 18 mesi a -20°C; le soluzioni di lavoro sono preparate al momento dell'uso. Gli estratti sono stabili conservati a 2-8°C per almeno una notte.

L'incertezza di misura estesa relativa percentuale del risultato è pari a 12% e risulta coerente con il valore di CCa calcolato.

CONCLUSIONI

Le migliori performances del metodo sono state ottenute con l'utilizzo della tecnica di purificazione basata sulla immunoaffinità (IAC), che determina l'elevata specificità e l'ottimo recupero in quanto trattiene selettivamente l'analita. Le colonnine IAC consentono inoltre di processare in un tempo relativamente breve (circa 3 ore) fino a 10 campioni in parallelo senza dispendio di grandi quantità solventi.

Il metodo messo a punto presenta caratteristiche di specificità, precisione e robustezza adeguate allo scopo, per cui risulta idoneo alle analisi sia di screening che di conferma effettuate nell'ambito dei controlli ufficiali.

Il metodo permette la determinazione quantitativa dell'aflatossina M1 nel range di concentrazione 0.040 – 0.500 mg/Kg.

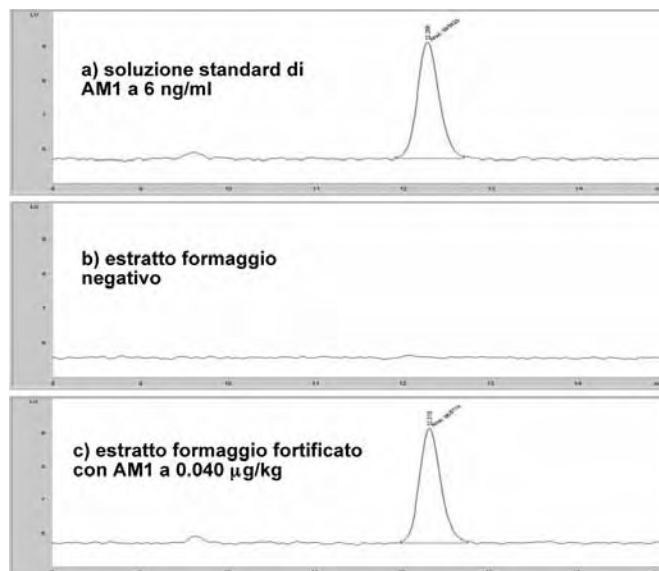
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Decisione della Commissione del 12 agosto 2002 (2002/657/CE), G.U.C.E. L.221, 2002.
2. Linea Guida per la validazione intra-laboratorio di metodi di prova di conferma per le sostanze di Categoria B"- rev. 0.
3. W.J.Youden, E.H.Steiner, Statistical Manual of AOAC, Association of Official Analytical Chemist, 33, 1975.

TAB.1 : INDICI DI PRESTAZIONE

LINEARITA'	Verificata tra 0.75 - 25 ng/ml		
SPECIFICITA'	Verificata su 23 campioni		
LOD	0.007 µg/Kg		
LOQ	0.040 µg/Kg		
CAMPO DI MISURA	0.040 – 0.500 µg/Kg		
	1° livello	2° livello	3° livello
LIMITE DI RIPETIBILITA' r (µg/Kg)	0.010	0.021	0.077
RIP. RISTRETTA (CV %)	6.9	5.6	5.2
RIP. INTERMEDIA (CV %)	6.3	7.8	5.6
RECUPERO % ± SD	79 ± 5.1	83 ± 6.2	89 ± 4.9
INCERTEZZA DI MISURA ESTESA % (n = 2, k = 2, p = 95%)	12		

Figura 1: cromatogramma analiti.



ALIMENTI TRASFORMATI DI ORIGINE OVINA: ACQUISIZIONE DI ELEMENTI UTILI PER LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO DA AGENTI BATTERICI DI ZOONOSI E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE

Mele P., Rosa MN., Pisanu M., Mula G., Cogoni P., Tola S., Virgilio S.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari

Key words: Sardinian ovine sausage, *Listeria monocytogenes*, PFGE

SUMMARY

L. monocytogenes strains were isolated from ovine fermented sausage and factory environment. Isolated strains were characterized by PFGE and found to be ascribable to serotypes frequently associated to human listeriosis outbreaks and commonly isolated from Italian salami. However, 100 cfu/g limit settled in Reg. EC 2073/2005 was never exceeded.

INTRODUZIONE

Le problematiche sanitarie correlate alla presenza di agenti zoonosici negli alimenti sono da tempo all'attenzione delle autorità sanitarie dell'Unione Europea.

Dagli ultimi dati pubblicati dall'EFSA / ECDC per l'anno 2009 emerge che le infezioni zoonosiche batteriche più frequentemente associate a patologie umane sono quelle causate da microrganismi veicolati dagli alimenti, soprattutto da *Salmonella* spp, *Campilobacter*, *E.coli* verocitotossici. *Listeria monocytogenes*. Per quanto riguarda in particolare le infezioni umane da *Listeria monocytogenes*, nel 2009 è stato riscontrato nella Unione Europea un aumento del 19% rispetto al 2008 con 1645 casi confermati e 270 decessi, con un tasso di letalità del 17% (1).

I dati bibliografici relativi alla presenza di agenti batterici di zoonosi nelle carni ovine e in prodotti da essa derivati sono scarsi e frammentari (2) (3).

Allo stato attuale non esistono inoltre studi di valutazione sulle eventuali o possibili relazioni tra il riscontro di agenti batterici di zoonosi in prodotti ovini di natura carnea e la comparsa nei consumatori di patologie derivanti dal consumo di tali alimenti.

In Sardegna recentemente sono state riproposte, da parte di alcuni salumifici, alcune lavorazioni di prodotti carnei ovini trasformati, tradizionalmente prodotti da pastori dediti alla transumanza che potevano utilizzare solamente le carni degli animali del proprio gregge per l'approvvigionamento alimentare.

Tali prodotti, realizzati a partire da carne ovina autoctona, sono diventati, nell'arco di breve tempo, alimenti di nicchia che stanno occupando nel mercato nazionale e internazionale uno spazio ben definito e di prestigio con interessanti prospettive commerciali sia nei paesi occidentali che in quelli di religione musulmana ed ebraica (produzioni *Halal* e *Kosher*).

Il prosciutto e la salsiccia di pecora, in particolare, costituiscono le tipologie di maggiore successo e verso le cui produzioni abbiamo rivolto la nostra attenzione nel corso della presente indagine che si proponeva di perseguire, conformemente a quanto disposto dal Regolamento CE 2073/2005 (4) sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari, i seguenti obiettivi:

- studio e definizione di caratteristiche di prodotto e di processo
- ricerca dei microrganismi agenti di zoonosi su ambienti di

produzione, operatori e prodotti (dall'ingresso in azienda della materia prima al confezionamento del prodotto finito)

- acquisizione, per i due prodotti, di elementi utili per un successivo allestimento di Challenge Test, studi di *Shelf life*, creazione di modelli di Microbiologia Predittiva.

A completamento di tali propositi si è, inoltre, provveduto alla

caratterizzazione molecolare e alla valutazione dei livelli di antibiotico resistenza dei ceppi degli agenti zoonosici isolati per un'eventuale comparazione con ceppi provenienti dalla diagnostica clinica umana attraverso il confronto molecolare degli stessi.

MATERIALI E METODI

La ricerca è stata eseguita presso un'azienda che produce salumi ovini e caprini di origine autoctona seguendo sia le tecniche tradizionali che quelle previste dalle regole *Halal* per i consumatori di religione musulmana e *Kosher* per quelli di fede ebraica. Una serie di visite preliminari nello stabilimento di produzione hanno consentito di redigere schede di prodotto e di processo per i due prodotti sulla cui base è stato concepito il seguente piano di campionamento.

- Materia prima: mediante utilizzo di "Sponge Bag" per ogni lotto produttivo sono state sottoposte a controllo il 10 -20 % delle carcasse ovine destinate alla trasformazione, provenienti da allevamenti allo stato brado di modesta entità con un massimo di 100 capi per un totale di 200 prelievi.

- Ambienti di produzione e operatori: mediante utilizzo di "Sponge Bag" i controlli sono stati eseguiti in tutti gli ambienti prima di ciascuna lavorazione, concentrando il maggior numero dei prelievi dove era più frequente la manipolazione della materia prima e il contatto con le attrezzature (sala disosso, sala lavorazione e sala confezionamento)

- Prodotti: La tabella 1 e la tabella 2 riportano lo schema seguito nell'applicazione del piano di campionamento per il prosciutto e la salsiccia di pecora su intermedi di produzione e prodotti finiti.

Tabella 1. Piano di campionamento del Prosciutto di pecora

N° lotti	Fasi produttive	N° campioni esaminati per fase produttiva	N° totale campioni esaminati
3	-Coscia fresca -Coscia dopo salatura (21 gg) -Coscia dopo essiccamento (5 gg) -Prosciutto a media stagionatura (60 gg.) -Prosciutto a fine stagionatura (120 gg)	3	45

Tabella 2 . Piano di campionamento della Salsiccia di pecora

N° lotti	Fasi produttive	N° campioni esaminati per fase produttiva	N° totale campioni esaminati
11	-Carne macinata -Impasto dopo concia -Salsiccia fine asciugatura (5 gg) -Salsiccia fine maturazione (21 gg)	3	150

Nella tabella n. 3 sono riportate le tecniche microbiologiche di isolamento e identificazione biochimica utilizzate.

Agente zoonosico	Metodo colturale e Identificazione biochimica
<i>Listeria monocytogenes</i>	UNI EN ISO 11290-1: 2005 UNI EN ISO 11290-2: 2005 API Listeria (BioMérieux)
<i>Salmonella</i> spp	ISO 6579:2002
<i>E. Coli</i> O157: H7	ISO 16654:2001
<i>Campylobacter</i> termotolleranti	ISO 10272-1:2006

Tabella 3 Tecniche di isolamento e identificazione biochimica

I campioni sono stati inoltre analizzati con metodiche biomolecolari secondo il seguente schema:

-Estrazione DNA totale da brodo di prearricchimento primario mediante l'utilizzo del kit "DNeasy Blood & Tissue Kit", Qiagen;

-Multiplex-PCR eseguita a partire dal DNA totale degli agenti zoonosici *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes*;

-PCR a partire dal DNA totale per *Campylobacter* termofili;

-Multiplex-PCR a partire dal DNA totale per l'identificazione di altre specie appartenenti al genere *Listeria*;

Contemporaneamente:

-Estrazione del DNA totale con fenolo-cloroformio, a partire da colture pure di ceppi di riferimento degli agenti zoonosici ricercati;

-Estrazione DNA totale degli isolati batterici di *Listeria monocytogenes*;

-PCR a partire da DNA totale dei ceppi isolati per la determinazione dell'appartenenza al genere *Listeria* (16S rRNA) e la presenza di 6 geni codificanti per alcuni fattori di virulenza (*actA*, *hlyA*, *plcB*, *prfA*, *iap* e *Lmo2821*);

-Determinazione del genotipo degli isolati mediante PFGE con tre diversi enzimi di restrizione (*Apal*, *Ascl* e *SmaI*) (5);

-Determinazione del sierotipo mediante l'impiego di antisieri commerciali prodotti da Denka Seiken Co., Tokio Japan;

Degli isolati è stata inoltre valutata l'antimicrobica resistenza verso 21 agenti antimicrobici diversi, mediante l'utilizzo di piastre *Sensititre* (Trek diagnostics, Cleveland, OH).

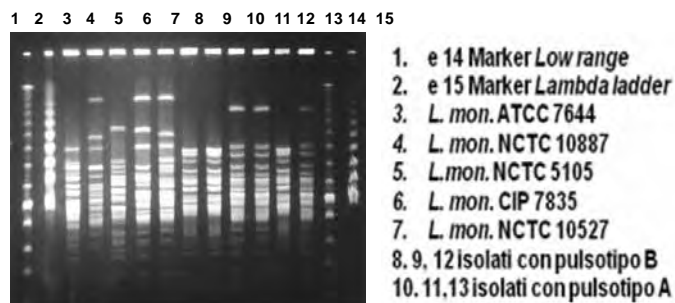
RISULTATI

Sulle carcasse ovine sottoposte a controllo e nei 3 lotti di produzione del prosciutto di pecora analizzati nel corso dell'indagine non è stata riscontrata presenza degli agenti

zoonosici ricercati. Il monitoraggio ambientale e delle attrezzature ha evidenziato la presenza di *L. monocytogenes* nei coltelli utilizzati in sala disosso, nell'impastatrice (lame e pareti), nei pozzetti della sala di lavorazione e sala di essiccamento. Per quanto riguarda la salsiccia di pecora la totalità dei campioni esaminati è risultata costantemente negativa alla ricerca di: *Salmonella* spp., *Campylobacter* termofili, *E. coli* O:157 H7, mentre *L. monocytogenes* è stata riscontrata nei semilavorati e nel prodotto finito. Nell'arco temporale della durata dell'indagine (3 anni) si è assistito alla progressiva diminuzione dei valori delle cariche rilevati. Infatti, se nei primi lotti esaminati la *Listeria* era stata isolata nella carne macinata con cariche medie di 33 UFC/g, nel corso dell'ultimo anno di monitoraggio su 6 lotti esaminati è stato possibile effettuare l'isolamento solo previo arricchimento (<10 UFC/g). In particolare, sono risultati positivi 2 lotti e solo in 1 di essi il riscontro del batterio si è protratto fino alla fase di fine stagionatura (positivo un campione su tre).

L'analisi biomolecolare ha confermato che tutti i ceppi batterici isolati dai campioni analizzati appartengono alla specie *L. monocytogenes* e possiedono i geni per i fattori di virulenza ricercati, compresa l'Internalina J.

L'analisi dei profili PFGE ha permesso di raggruppare gli isolati in due pulsotipi: al pulsotipo A appartengono 12 ceppi con sierotipo 1/2a, isolati da un solo lotto di lavorazione, mentre al pulsotipo B appartengono 54 ceppi con sierotipo 1/2b, isolati dai restanti lotti e da alcune attrezzature e pozzetti di drenaggio.

Figura 1 Profili PFGE con *Apal* dei ceppi di *L.monocytogenes* isolati

Gli isolati sono risultati resistenti all'oxacillina e alla tigeclina ma sensibili a tutti gli altri antimicrobici testati.

DISCUSSIONE

I sierotipi di appartenenza degli isolati batterici (1/2a e 1/2b) rientrano tra quelli più frequentemente coinvolti in episodi di listeriosi umana (1/2a, 1/2b e 4b) (6) e tra quelli più frequentemente riscontrati nei salami italiani (1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b) (7).

Le cariche di *L. monocytogenes* riscontrati nella salsiccia di pecora tuttavia non hanno mai superato nel corso dei controlli il valore di 100 U.F.C./g stabilito dalla normativa vigente per i prodotti pronti per il consumo (4).

Il ripetuto rinvenimento del batterio in ambienti di produzione e attrezzature conferma come *L. monocytogenes* possa entrare a far parte della microflora autoctona della struttura produttiva (ceppi residenti) e sottolinea l'importanza delle azioni atte a gestirne nel tempo la presenza con modalità sempre più efficaci, intervenendo progressivamente mediante:

- il miglioramento delle operazioni di sanificazione delle superfici di lavorazione e degli ambienti;
- la formazione accurata degli operatori in materia di igiene e Buone Pratiche di Lavorazione (BPL);
- l'approfondimento delle conoscenze sulla dinamica delle caratteristiche del prodotto (pH, A_w , Temp., concentrazione salina, tempi di stagionatura ecc...), che come è noto, se ben gestiti, rappresentano parametri limitanti la crescita e la moltiplicazione batterica.

Questi primi elementi emersi nel corso di questa ricerca confermano la necessità di validare il processo produttivo della salsiccia di pecora attraverso studi di Microbiologia predittiva, MCT Challenge Test, Biocompetizione batterica, valorizzazione delle proprietà intrinseche del prodotto.

BIBLIOGRAFIA

- 1) EFSA Journal 2011; 9 (3) : 2090 (378 pp)
- 2) Mazzette R. et al., 2000. Valorizzazione delle carni ovine: utilizzazione per la produzione dei prodotti di salumeria. Atti Conv. Internazionale Produzioni Alimentari e qualità della vita.
- 3) Rosa M.N., Mele P., Parisi A., Latorre L., Virgilio S. and Tola S. 2010. Molecular typing of *Listeria monocytogenes* isolate from ovine sausage. Porto: Atti XVII International Symposium on Problems of Listeriosis, pag.:106.
- 4) Reg.CE 2073/2005, G.U.U.E. L 338/1
- 5) Graves, L. M., Swaminathan B.. 2001. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. International Journal of Food Microbiology. Vol. 65, pagg.: 55-62
- 6) Vasquez-Boland J.A. et al. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clinical Microbiology Review. Vol. 14, N° 3, pagg.: 584-640.
- 7) Gianfranceschi M. V.et al.. 2006a. Survival of *Listeria monocytogenes* in uncooked italian dry sausage (salami). Journal Food Protection. Vol. 69, pagg.: 1533-1538.

STUDIO PRELIMINARE SULLA PRESENZA DI MICRORGANISMI PATOGENI IN VEGETALI DI I E IV GAMMA

Mele P., Assaretti A., Delogu A., Porqueddu G., Rossi M.L., Terrosu G., Fadda A.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Dipartimento Igiene degli Alimenti, Sassari

Keywords: vegetables, PCR Real Time

SUMMARY

A survey was carried out on n. 356 samples of unprocessed and minimally processed vegetables placed on Sardinian market to detect presence of *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *E.coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni*, *coli, lari* and *Y. enterocolitica* by PCR-Real Time and ISO microbiological methods. Results show that marketed vegetables are acceptable on food safety grounds as none of the samples was confirmed contaminated by searched pathogen bacteria.

INTRODUZIONE

Il consumo di frutta e ortaggi in Italia è progressivamente aumentato negli ultimi vent'anni (1). Nell'ambito di questa tipologia di prodotti vengono definiti di I gamma quelli freschi e non sottoposti a trattamento, mentre i prodotti ortofrutticoli di IV gamma sono, secondo la Legge n. 77 del 13 maggio 2011, i "prodotti ortofrutticoli destinati all'alimentazione umana freschi, confezionati e pronti per il consumo che, dopo la raccolta, sono sottoposti a processi tecnologici di minima entità atti a valorizzarli seguendo le buone pratiche di lavorazione articolate nelle seguenti fasi: selezione, cernita, eventuale monda e taglio, lavaggio, asciugatura e confezionamento in buste o in vaschette sigillate, con eventuale utilizzo di atmosfera protettiva". I vegetali di IV gamma rappresentano attualmente uno dei più promettenti e innovativi comparti del settore ortofrutticolo, mostrando trend di crescita di assoluto rilievo (solo nel 2006 un aumento del 23 % dei consumi rispetto all'anno precedente); tali prodotti conciliano le richieste degli attuali consumatori, i quali esigono prodotti freschi ma che allo stesso tempo riducano il tempo di preparazione dei pasti (2). Il Reg. (CE) n. 2073/05 (3) fissa i criteri microbiologici per i vegetali di IV gamma sia per quanto riguarda i criteri di sicurezza (*L. monocytogenes* e *Salmonella spp.*), che per i criteri di igiene di processo, individuando per *E. coli* un limite da applicare durante il processo di produzione. In seguito al recente caso di tossinfezione in Germania, dovuta alla presenza di un ceppo patogeno di *E. coli* in vegetali, i consumi di ortofrutta in Europa sono drasticamente calati provocando un danno economico per gli agricoltori quantificabile in diverse centinaia di milioni di euro. Tuttavia, al di là dell'eco mediatica dedicato a quest'ultimo caso, parallelamente alla diffusione dei prodotti di IV gamma e ready-to-eat, è in aumento il numero di tossinfezioni associabili a prodotti vegetali. In un report dell'EFSA del 2009 (4) emerge che tra i casi positivi di *Salmonella* negli alimenti, segnalati dagli Stati della Comunità Europea, il 12,6 % erano riferibili a frutta e vegetali, mentre diverse sono le segnalazioni di *E.coli* in vegetali come ravanella (5), spinaci (6), lattuga (7), a dimostrazione del fatto che in letteratura è documentata la presenza di patogeni in questa matrice. Un recente studio (8) ha inoltre messo in evidenza come alcuni ceppi di *E.coli* siano dotati di meccanismi che gli permettono di aderire alle foglie dei vegetali, potendo rendere inefficaci le operazioni di lavaggio. Scopo del lavoro è stato quello di acquisire informazioni e dati relativi alla eventuale presenza di patogeni nella filiera dei vegetali freschi di I e IV gamma.

MATERIALI E METODI

Tra il mese di Gennaio e Luglio 2011 sono stati prelevati presso supermercati, mercati e negozi al dettaglio di Sassari e Olbia n. 356 campioni di vegetali di I e IV gamma. Le tipologie campionate sono specificate nella tabella 1 e 2 e nel grafico 1.

Tabella 1. Tipologie di prodotti campionati

Tipologia vegetali di I gamma	n. campioni	Tipologia vegetali di IV gamma	n. campioni
Radicchio	43	Iceberg	24
Lattuga	29	Carote	23
Iceberg	32	Rucola	19
Indivia Belga	32	Valeriana	8
Coppetta	22	Lattuga	6
Indivia riccia	16	Scarola	3
Scarola	4	Indivia Riccia	1
Trevisana	1	Cavolo Cappuccio	1
Rucola	1	Germogli di fagiolo	1
		Mix	90
Totale	180		176

La preparazione del campione per i prodotti di I gamma prevedeva che ciascuno di essi, senza subire l'allontanamento dei residui di terra della parte radicolare del torso e delle foglie esterne, venisse sminuzzata con un coltello sterile in modo tale da ottenere pezzi di dimensioni di circa 5-10 cm². I prelievi (25 g) venivano effettuati su più punti per garantire una maggiore uniformità di presa. Per i prodotti di IV gamma veniva eseguito un prelievo diretto da più punti della confezione per garantire la rappresentatività del campione. I campioni venivano quindi trasferiti all'interno di buste sterili contenenti lo specifico terreno di arricchimento e sottoposti a massaggio manuale per almeno 60 secondi, in modo tale da garantire il risciacquo della superficie del vegetale in esame senza comprometterne l'integrità. Per i sottoelencati patogeni il terreno di arricchimento e i parametri di incubazione erano i seguenti:

- *L. monocytogenes*: Half Fraser Broth a 30°C per 24 ore ± 2 ore
- *Salmonella spp.*: Buffered Peptone Water a 37°C ± 1°C per 18 ore ± 2 ore
- *E.coli* O157:H7: Trypticase Soy Broth con novobiocina a 37°C ± 1°C per 24 ore ± 2 ore
- *Campylobacter jejuni, coli, lari*: Bolton Broth a 37°C per 4-6 ore, in seguito 41,5° per 44 ore ± 4 ore in microaerofilia

Per la ricerca di *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *E.coli* O157:H7 e *Campylobacter jejuni, coli, lari* è stato utilizzato il Kit commerciale ADIAFOOD RAPID PATHOGEN DETECTION SYSTEM – AES CHEMUNEX per la determinazione rapida dei patogeni basato sulla tecnologia della PCR Real Time, che schematicamente prevede:

1. Preparazione del campione
2. Estrazione del DNA
3. Amplificazione mediante specifici primers e molecular beacons. I risultati ottenuti venivano analizzati automaticamente con la tecnologia sviluppata da AES CHEMUNEX mediante il software Sentinel®.

Il protocollo operativo prevedeva che i campioni risultati positivi alle analisi in Real-Time PCR venissero processati per la ricerca di *L. monocytogenes* (UNI EN ISO 11290-1:2005), *Salmonella* spp. (ISO 6579:2002), *E.coli* O157:H7 (ISO 16654:2001), *Campylobacter jejuni, coli, lari* (ISO 10272:2006). Infine, sui campioni veniva eseguita la ricerca di *Yersinia enterocolitica* mediante tecnica colturale (ISO 10273:2003).

Grafico 1. Tipologie di mix-IV gamma campionate

Tabella 2. Descrizione delle tipologie di mix-IV gamma più frequentemente campionate

mix 2	Riccia, radicchio, carote, scarola, pan di zucchero
mix 3	Lattughino, lattughino rosso, rucola, lattuga, spinacino
mix 4	Scarola, riccia, radicchio rosso
mix 5	Radicchio, riccia, valerianella
mix 6	Lattughino, lattughino rosso, rucola, valerianella, spinacino
mix 7	Riccia, scarola, pan di zucchero, radicchio
mix 8	Lattughino, lattughino rosso, valerianella, spinacino
mix 13	Insalata riccia, scarola, pan di zucchero, radicchio

RISULTATI

La totalità dei campioni analizzati per la ricerca di *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *E.coli* O157:H7 è risultata negativa alla ricerca mediante Real-Time PCR. Con tale metodica un solo campione ha dato esito positivo per *Campylobacter jejuni, coli, lari*, ma il dato non è stato confermato alla successiva ricerca mediante metodo colturale. Un basso numero di campioni sottoposti a Real-Time PCR ha mostrato inibizione durante la fase dell'amplificazione, ma la successiva applicazione della tecnica colturale ha dato sempre esito negativo (Tabella 3).

Tabella 3. Campioni inibiti e positivi alla Real-Time PCR

Microrganismo	n. analizzati	n. inibiti	n. + PCR
<i>L. monocytogenes</i>	356	12	0
<i>Salmonella</i> spp.		2	0
<i>E.coli</i> O157: H7		2	0
<i>Campylobacter jejuni, coli, lari</i>		6	1

Nessun campione è risultato positivo per *Yersinia enterocolitica*.

DISCUSSIONE

L'assenza di microrganismi patogeni in tutti i campioni analizzati, confermata anche dagli esami colturali, sembra possa suggerire un livello di sicurezza igienico-sanitaria accettabile in questi prodotti. Tuttavia, come hanno dimostrato i recenti casi di tossinfezione in Germania e come riportato da

recenti studi scientifici (9), diversi germi patogeni, in particolare quelli dotati di caratteristiche psicrofile, hanno buone capacità di crescita in questa tipologia di alimenti, rappresentando quindi un potenziale e non trascurabile pericolo per la salute del consumatore. Inoltre la maggior parte di questi alimenti è costituita da prodotti ready-to-eat e quindi non viene di solito sottoposta dal consumatore a operazioni che abbiano come obiettivo l'eliminazione della flora microbica eventualmente presente. In particolare nei prodotti di IV gamma quest'ultimo aspetto acquisisce ancora maggiore importanza, in quanto il prodotto non viene abitualmente sottoposto neanche a lavaggio prima del consumo. In conclusione, appare importante, per i vegetali di I gamma, raccomandare sempre un accurato lavaggio prima del consumo. Per quanto riguarda la IV gamma sembra necessario, al fine di salvaguardare la qualità igienico-sanitaria del prodotto, l'utilizzo di materie prime dotate già all'origine di adeguate caratteristiche sotto il profilo della sicurezza alimentare, il rispetto delle norme igieniche durante il processo produttivo e della catena del freddo lungo tutta la filiera (10).

BIBLIOGRAFIA

- 1- www.istat.it
- 2- Baldi L. "Speciale IV Gamma: Evoluzione e prospettive del settore" Informatore agrario. 2007/16, 41-45
- 3- Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari. L 338/1
- 4- The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009
- 5- Michino H., Araki K., Minami S., Takaya S., Sakai N., Miyazaki M., Ono A., and Yanagawa H. (1999) Massive outbreak of Escherichia coli O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. Am. J. Epidemiol. 150:787-796.
- 6- www.cdc.gov/foodborne/ecolispinach/100606.htm
- 7- Söderström A., Lindberg A., Andersson Y. (2005) EHEC O157 outbreak in Sweden from locally produced lettuce. Eurosurveillance, Volume 10, Issue 38
- 8- Shaw R. K., Berger C.N., Feys B., Knutton S., Pallen M. J., and Frankel G. (2008) Enterohemorrhagic Escherichia coli Exploits EspA Filaments for Attachment to Salad Leaves. Applied and environmental microbiology, May 2008, p. 2908-2914.
- 9- Morgante R.A., Mencaroni G, Scuota S., Cenci T. (2009) Comportamento di microrganismi patogeni in insalate di IV gamma. Sanità Pubblica Veterinaria Nuova Serie n. 52, Febbraio 2009, Vol. X
- 10- Morgante R.A., Mencaroni G, Scuota S., Cenci T. (2008) Indagine conoscitiva sui vegetali di IV gamma. Sanità Pubblica Veterinaria Nuova Serie numero doppio n. 50-51, Dicembre 2008, Vol. IX

RING TEST EST 2010: IL FILTRO DELLA NORMA ISO/IEC 17043

Meloni D., Manzardo E., Nocilla L., Varello K., Pezzolato M., Mazza M., Ingravalle F., Bozzetta E.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta - Torino

Key words: EST, Ring Test, Norma ISO/IEC 17043:2010

SUMMARY

Reg. (CE) 999/2001 lays down rules regarding the National Reference Laboratories responsibility in coordinating the diagnostic standards and the methods within each Member State. In 2010, Italian National Reference Laboratory set up an interlaboratory comparative test to verify the performance of the Istituti Zooprofilattici net on the application of the IDEXX Herd Check BSE Antigen Kit EIA. The ring trial was organized according to the new ISO/IEC 17043/2010 "Conformity assessment – General requirements for proficiency testing". All the Italian labs obtained correct results.

INTRODUZIONE

Ai sensi del Regolamento EU 999/2001 (1) i Centri di Riferenza Nazionali per le Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST) sono responsabili del coordinamento delle norme e dei metodi diagnostici nello Stato membro e uno degli strumenti di monitoraggio è l'organizzazione di periodiche prove comparative.

Nel 2010 nell'ottica di adeguare il proprio sistema qualità ai migliori standard internazionali, il Centro di Riferenza Italiano (CEA) ha voluto ottemperare a quanto disposto nella recente Norma ISO/IEC 17043/2010 "Conformity assessment – General requirements for proficiency testing" (2) che specifica i requisiti per la competenza degli organizzatori di prove valutative interlaboratorio e per la pianificazione ed il funzionamento di detti schemi, annullando e sostituendo precedenti Norme specifiche.

La ISO/IEC 17043/2010 rappresenta una corposa guida per coloro che si occupano di organizzare tali attività; detta requisiti tecnici e gestionali dettagliati e complessi, senza tralasciare la descrizione della tipologia degli schemi organizzativi applicabili, con indicazione dei parametri di selezione degli stessi e dei metodi statistici più congrui. Migliora inoltre i requisiti per promuovere l'effetto educativo delle prove valutative.

Ad oggi in Italia non ci sono ancora organizzazioni accreditate a fronte di questa nuova norma. E' importante notare come la ISO/IEC 17025/2005 (3) richieda la partecipazione e la gestione di prove interlaboratorio, inoltre ACCREDIA esige la partecipazione ai proficiency test (RT) come requisito per l'accreditamento.

MATERIALI E METODI

Obiettivi del Ring Test

- 1) Confermare la competenza tecnica dei laboratori e monitorarne l'efficienza nel tempo;
- 2) valutare l'affidabilità del sistema diagnostico nazionale;
- 3) valutare le performance dei kit diagnostici;
- 4) identificare eventuali problemi nei Laboratori;
- 5) utilizzare i risultati per il miglioramento tecnico interno;

Tipologia dei partecipanti

Laboratori della rete degli IIZZSS responsabili dell'attività di sorveglianza attiva delle EST

Criteri di partecipazione

I partecipanti hanno espresso formale adesione al RT nazionale EST, con piena accettazione del "Piano di funzionamento dei RT".

Istruzioni per i laboratori

Sono state fornite dettagliate istruzioni in merito a: tipologia dei campioni componenti i set, corretta manipolazione e classe di rischio.

Possibili principali sorgenti di errore

Sono state elencate le fonti di errore più probabili al fine di minimizzare esiti non conformi.

Criteri di valutazione dell'omogeneità e stabilità del materiale di prova

OMOGENEITÀ: durante la fase di preparazione delle aliquote destinate ai laboratori, sono stati allestiti, in modo casuale, due set analoghi per numero e composizione a quelli inviati. I due set sono stati sottoposti a test rapido ed il risultato ad analisi statistica.

STABILITÀ: un set di campioni è stato testato immediatamente prima dell'invio del primo pannello di campioni ed immediatamente dopo la ricezione dell'ultimo risultato. E' stata effettuata l'analisi statistica dei risultati.

La conformità di tali parametri ha consentito di garantire la congruità del materiale inviato al fine della valutazione del risultato.

Metodo statistico

Il disegno dello studio del RT è stato finalizzato alla valutazione della riproducibilità del metodo diagnostico tra i partecipanti al circuito. Per misurare il grado di accordo (concordanza) tra i partecipanti è stato utilizzato l'indice kappa (k) di Cohen (4, 5). In particolare sono stati calcolati:

- 1) il k (con relativo intervallo di confidenza al 95%) per i risultati ottenuti per ciascuna coppia di partecipanti;
- 2) il k (con relativo intervallo di confidenza al 95%) per i risultati ottenuti da ciascun partecipante rispetto al giudizio di maggioranza (valore modale per ciascun campione);
- 3) per ciascun partecipante, il k-overall (con relativo intervallo di confidenza al 95%) dei risultati ottenuti dal partecipante rispetto agli altri;
- 4) il k-combined (con relativo intervallo di confidenza al 95%) dei risultati ottenuti da tutti i partecipanti insieme.

I risultati acquisiti sono stati inoltre elaborati per valutare l'accuratezza dei partecipanti, calcolando:

- 1) sensibilità e specificità (con relativi intervalli di confidenza al 95%) per ciascun partecipante;
- 2) sensibilità media e specificità media (con relativi intervalli di confidenza al 95%) della rete diagnostica.

Criteri di valutazione delle prestazioni

Il CEA ha stabilito i criteri di accettabilità dei risultati delle prove in base agli standard nazionali attesi per la sorveglianza attiva

dettati dalla normativa vigente ed in accordo con il Ministero della Salute.

La numerosità campionaria ($n = 30$) è stata stabilita in modo tale che:

- 1) in caso di perfetta concordanza tra i risultati forniti da due partecipanti (cioè $k=1$), il limite inferiore dell'intervallo di confidenza al 95% attorno a k fosse pari ad almeno 0.60;
- 2) in caso di una sola discordanza tra i risultati forniti da due partecipanti (cioè $k=0.91$), il limite inferiore dell'intervallo di confidenza al 95% attorno a k fosse pari ad almeno 0.56;

L'assegnazione della numerazione alle aliquote componenti il set di campioni è stata eseguita secondo opportuni criteri di randomizzazione.

RISULTATI

Ring Test BSE

OMOGENEITÀ: coefficiente di correlazione intraclasse (ICC) = 0.98784 (IC95%: 0.97911 - 0.99656)

STABILITÀ: coefficiente di correlazione intraclasse (ICC) = 0.91197 (IC95%: 0.85122 - 0.97271)

L'accordo complessivo tra tutti i laboratori partecipanti è risultato pari ad 1, con intervallo di confidenza al 95% (IC95%) 0.97 – 1.00.

La sensibilità diagnostica complessiva (ossia media) dei laboratori è risultata pari al 100%, con intervallo di confidenza al 95% (IC95%) 66.37 - 100%.

La specificità diagnostica complessiva (ossia media) dei laboratori è risultata pari al 100%, con intervallo di confidenza al 95% (IC95%) 83.89 - 100%.

Ring Test scrapie

OMOGENEITÀ: coefficiente di correlazione intraclasse (ICC) = 0.98784 (IC95%: 0.97911 - 0.99656)

STABILITÀ: coefficiente di correlazione intraclasse (ICC) =

0.91197 (IC95%: 0.85122 - 0.97271)

L'accordo complessivo tra tutti i laboratori partecipanti è risultato pari ad 1, con intervallo di confidenza al 95% (IC95%) 0.97 – 1.00.

La sensibilità diagnostica complessiva (ossia media) dei laboratori è risultata pari al 100%, con intervallo di confidenza al 95% (IC95%) 66.37 - 100%.

La specificità diagnostica complessiva (ossia media) dei laboratori è risultata pari al 100%, con intervallo di confidenza al 95% (IC95%) 83.89 - 100%.

CONCLUSIONI

Tutti i laboratori hanno identificato correttamente i campioni.. Pertanto la sensibilità e specificità si sono attestati su livelli massimi sia per singolo partecipante che per l'intera rete diagnostica.

I risultati sono stati perfettamente riproducibili tra i partecipanti. Il nuovo approccio organizzativo ha consentito una condivisione dell'intero *modus operandi* del CEA con i fruitori del RT, garantendo piena trasparenza del processo e promozione dell'effetto educativo della prova valutativa. La comunicazione con i partecipanti si è dimostrata efficace, per cui il feedback è stato esuberante e positivo. Il nuovo sistema ha consentito inoltre una raccolta dei risultati efficiente, sistematica e precisa da cui è sortita un'agevole elaborazione statistica.

BIBLIOGRAFIA

1. Reg CEE 999/2001 22/05/2001 GU CEE L147/1 31/05/2001
2. ISO/IEC 17043:2010
3. UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005
4. Fleiss J.L., B. Levin., M. Cho Paik. (3rd ed.) 2003. Statistical methods for rates and proportions. John Wiley & Sons, New York
5. Shoukri M.M. 2004. Measures of interobserver agreement. Chapman & Hall/CRC, New York

TEST RAPIDI BSE: SENSIBILITA' ANALITICA NELLA DIAGNOSI DELLE FORME ATIPICHE

Meloni D.*, Varello K.*, Pitardi D.*, Pezzolato M.*, Casalone C.*, Balkema-Buschmann A.°, Groschup M.°, Davidse A.△, Langeveld J.P.M.△, Cavarretta M.C.*, Loprevite D.*, Mazza M.*, Ingravalle F.*, Bozzetta E.*

*CEA, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

°Friedrich-Loeffler Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Insel Riems, Germany

△Central Veterinary Institute of Wageningen UR (CVI), Lelystad, the Netherlands

Key words: BSE Atipiche, test rapidi, sensibilità analitica.

ABSTRACT

In 2008 the European Community Reference Laboratory (CRL) investigated the analytical sensitivity of all the approved TSE rapid tests for classical and atypical scrapie and experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE). The objective of this study was to evaluate the analytical sensitivity of the current EU-approved rapid *post mortem* BSE tests for atypical BSEs. All the tests performed within a maximal 2 log₁₀ inferiority range as compared to the most sensitive systems. No potential differences in field detection performance can be inferred on the sole basis of the difference in analytical sensitivity.

INTRODUZIONE

L'Encefalopatia Spongiforme Bovina (BSE) è una malattia neurodegenerativa indotta da un agente trasmissibile comunemente noto come prione. E' caratterizzata dall'accumulo nel sistema nervoso centrale (SNC) di una isoforma anomala della proteina prionica naturale (PrP^C) denominata PrP^{res}. Fino al 2004 era stata ipotizzata l'esistenza di un unico ceppo di BSE, tuttavia studi eseguiti in Italia (1) ed in Francia (2) svelarono l'esistenza di tre ceppi di BSE, la cui differenziazione è possibile mediante l'analisi del profilo molecolare della PrP^{res} al Western Blot. La forma classica (C-Type) coesiste con l'atipica di tipo H (H-Type) e con quella di tipo L (L-Type), altrimenti nota come bovine amyloidotic spongiform encephalopathy (BASE). Le forme atipiche di BSE H ed L mostrano al Western Blot una massa molecolare della PrP^{res} non glicosilata rispettivamente più e meno elevata rispetto alla BSE classica e, mirabilmente per la L Type, una proporzione inferiore della banda diglicosilata di PrP^{res}. I test diagnostici rapidi sono disponibili dagli ultimi anni '90 e, successivamente alla prima loro applicazione in Svizzera nel '99, è stato diffusamente riconosciuto come essi rappresentino un'arma insostituibile per l'acquisizione di dati epidemiologici oltre che per evitare l'ingresso di alimenti infetti nelle filiere alimentari.

La sorveglianza attiva nei confronti della BSE è stata introdotta in Italia nel 2001(3). Parte integrante del programma di sorveglianza è rappresentato da una procedura di screening standardizzata. Per assicurarne l'uniformità di applicazione, sono stati validati a livello comunitario in anni successivi 19 test diagnostici rapidi dei quali 9 sono attualmente autorizzati. Se la prima valutazione teneva conto solo dei parametri fondamentali di sensibilità e specificità diagnostica dei metodi e della loro sensibilità analitica (4), nel corso delle successive valutazioni si è presa in considerazione anche la robustezza dei test, simulando la routine diagnostica (5).

Nel 2009 il Laboratorio di Riferimento Europeo per le TSE (CRL) ha studiato la sensibilità analitica dei Test Rapidi approvati al fine di confermarne la validità diagnostica per la sorveglianza attiva (6) a cui ha fatto seguito la pubblicazione di una Opinione della Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) in base alla quale alcuni test diagnostici rapidi in uso sono stati giudicati non più idonei (7).

E' noto come diversi test rapidi abbiano consentito nel mondo la diagnosi di BSE atipica, tuttavia l'analisi puntuale della sensibilità analitica dei test rapidi approvati sulle forme atipiche appare cruciale al fine di poter acquisire dati epidemiologici attendibili che conducano ad una corretta analisi del rischio per le forme atipiche di BSE, e/o all'eventuale modifica della regolamentazione in vigore tenendo anche in considerazione che la recente trasmissione sperimentale delle forme atipiche di BSE suggerisce come esse possano essere più insidiose rispetto alla forma classica (8). Il presente progetto si propone di stabilire la sensibilità analitica, ovvero il limite di rilevazione di tutti i test rapidi approvati per la sorveglianza attiva nei confronti delle forme atipiche di BSE di tipo L ed H. Al fine di rendere attuabile un confronto diretto sono state utilizzate identiche matrici per tutti i test.

MATERIALI E METODI

Tutti i test saggiati sono regolarmente approvati dal Reg. (EC) N. 999/2001 modificato dal Reg. 162/2009.

Enfer Scientific non ha accettato di partecipare al presente studio. Il test Prionics® Check LIA, pur essendo approvato, non è più in produzione.

Ciascun test è stato valutato su due serie di diluizioni scalari logaritmiche da 1/2 a 1/1024 di tessuti confermati positivi in tessuto confermato negativo per BSE allestite sia in ottemperanza al protocollo ufficiale di ciascun test sia al 50% in acqua in base al metodo di omogeneizzazione campioni del Laboratorio di Riferimento Europeo (CRL).

Origine dei tessuti nervosi

Le matrici positive per BSE tipo L appartenevano a due casi Italiani di campo. I tessuti BSE tipo H positivi, forniti dal Friedrich-Loeffler-Institut (Germany), provenivano da bovini tedeschi inoculati sperimentalmente. Il materiale positivo per BSE tipo C a forte segnale proveniva da bovini Olandesi diagnosticati in sorveglianza attiva ed è stato fornito dal Veterinary Institute of Wageningen, (the Netherlands), mentre quelli di BSE tipo C con segnale debole provenivano da casi naturali Italiani. I tessuti negativi originano da 30 bovini regolarmente macellati e testati con IDEXX HerdCheck BSE.

Preparazione delle matrici

Sono stati allestiti 5 pool (L, H, Cs and Cw) rispettivamente a partire da tessuti positivi di Sistema Nervoso Centrale (SNC) di BSE tipo L, tipo H, tipo C forte e tipo C debole ed un pool di tessuto negativo (N). I tessuti positivi sono stati toelettati, raggruppati in pool omogenei, triturati con un bisturi e successivamente trattati con un omogenizzatore a bassa velocità. Ciascun pool è stato suddiviso in due parti di cui una è stata stoccata a -80 °C e riservata alla successiva preparazione delle aliquote con protocollo ufficiale di ciascun test, l'altra è stata subito utilizzata per produrre le aliquote al 50% w/v. Il pannello di campioni comprendeva 150 aliquote, 30 per ciascun pool, per ogni test rapido. Ciascuna aliquota è stata testata in triplicato.

Esecuzione dei Test Rapidi

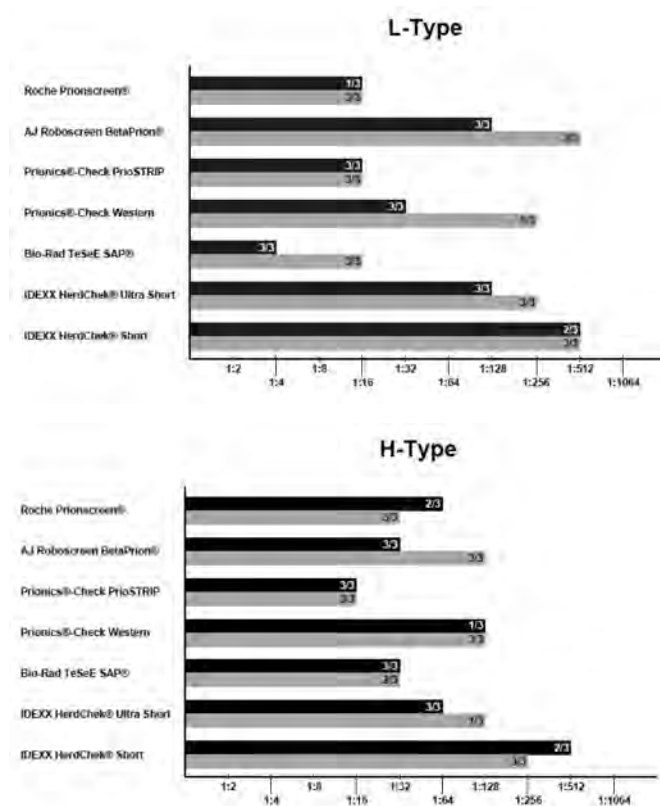
I tessuti positivi sono stati omogeneizzati con i buffer specifici come da protocolli ufficiali dei diversi test e successivamente diluiti scalarmene. Tali diluizioni sono state immediatamente sottoposte a test. Nella stessa seduta di lavoro sono state testate anche le aliquote omogeneizzate con protocollo CRL, nonché i campioni negativi. E' stato dedicato un giorno per ogni singolo test, durante il quale l'intero pannello di campioni è stato testato.

Test valutati

- Prionics® Check PrioSTRIP, Prionics AG, Wagistrasse 27a, CH-8952 Schlieren-Zurich, Switzerland.
- Prionics® Check Western BSE, Prionics AG, Wagistrasse 27a, CH-8952 Schlieren-Zurich, Switzerland.
- Bio-Rad TeSeE, Bio-Rad, 3, Boulevard Raymond Poincaré, F-92430 Marnes la Coquette, France.
- IDEXX Herd Check BSE Antigen Kit EIA, Idexx Laboratories Inc., Westbrook, ME, U.S. Short and Ultra-short protocol.
- Roboscreen βprion BetaPrion® BSE EIA Test Kit AJ Roboscreen, Leipzig, Germany.
- Prionscreen Test Roche Diagnostics, Penzberg, Germany.

RISULTATI

I grafici riportano i risultati preliminari relativi alle forme atipiche. Non sono stati inseriti i risultati riferibili alla BSE classica. La banda scura identifica le diluizioni con protocollo 50% w/v, la chiara quelle da protocollo del test. n/N rappresenta il numero di repliche positive.



DISCUSSIONE/CONCLUSIONI IN BREVE

La sensibilità analitica dei test presi in esame rientra nei parametri di accettabilità espressi dall'EFSA per i test applicabili in sorveglianza attiva (9) ovvero il limite di rilevazione non è inferiore di più di 2 logaritmi in base 10 rispetto quello del al test più sensibile. Tuttavia, emergono rilevanti differenze nella sensibilità dei diversi sistemi diagnostici. Non si sono verificati problemi di specificità. Le prestazioni dei test rapidi per le forme atipiche di BSE mimano quelle per la BSE classica riportate nell' Opinione EFSA-2009.

BIBLIOGRAFIA

1. Casalone C, Zanusso G, Acutis P, Ferrari S, Capucci L, et al. (2004) Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3065–3070.
2. Biacabe AG, Laplanche JL, Ryder S, Baron T (2004) Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Rep* 5: 110–115.
3. European Commission: Regulation (EC) No 162/2009 of the European Parliament and of the Council of 26 February 2009 amending Annexes III and X to Regulation (EC) No 999/2001 laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies. In *Off J Eur Communities Volume 55*. Edited by: European Commission. Official Journal of European Communities; 2009:11-16.
4. Moynagh J, Schimmel H, Kramer GN: The evaluation of tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines. Unit B3 Management of Scientific Committees, Directorate General 24 Consumer Policy and Health Protection; 08/07/1999.
5. European Commission health & Consumer Protection Directorate-General Scientific Steering Committee: Opinion of the Scientific Steering Committee on the field trial evaluation of two new rapid BSE post mortem tests. Adopted on 6 March 2003.
6. Kath Webster, Mike Flowers, Claire Cassar and Daniele Bayliss (2009) Determination of analytical sensitivity (detection limit) for currently approved tse rapid tests - final report. TSE Community Reference Laboratory - Veterinary Laboratories Agency Weybridge, UK.
7. European Food Safety Authority (EFSA): Scientific Opinion on Analytical sensitivity of approved TSE rapid tests. *The EFSA journal* 2009, 7(12):1436.
8. Balkema-Buschmann, A. , Ziegler, U. , McIntyre, L. , Keller, M. , Hoffmann, C. , Rogers, R. , Hills, B. and Groschup, M. H.(2011) 'Experimental Challenge of Cattle with German Atypical Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) Isolates', *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 74: 2, 103 — 109.
9. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission on a protocol for the evaluation of new rapid BSE *post mortem* tests. *The EFSA Journal* (2007) 508, 1-20.

CONTROLLI DI PROCESSO PRESSO IL LABORATORIO TEST RAPIDI DEL CENTRO DI REFERENZA NAZIONALE PER LE EST

Meloni D., Manzardo E., Cavarretta M.C., Loprevite D., Ingravalle F., Pistone G., Bozzetta E.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta - Torino

Key words: Controllo di processo, Carta di controllo, Test Rapido

SUMMARY

In conformity to UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005, the Italian National Reference Laboratory set up several control charts to determine whether or not the application of the IDEXX Herd Check BSE Antigen Kit EIA Ultra Short Protocol is in a state of statistical control. Some points representing measurements of a quality characteristic in samples taken from the process were selected and monitored. Any observations plotting outside the defined criteria suggest the introduction of source of variation, which cause is regularly identified and investigated.

INTRODUZIONE

La norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 (1) ed il documento ACCREDIA RT-08 "Prescrizioni per l'accreditamento dei laboratori" (2) prevedono che i laboratori di prova accreditati dispongano di procedure di tenuta sotto controllo della qualità per monitorare la validità delle prove e delle tarature effettuate. I dati risultanti devono essere registrati in modo che le tendenze siano rilevabili, a tal fine possono essere utilizzate idonee carte di controllo, strumenti utili per mantenere sotto controllo i vari parametri di un processo. Il monitoraggio deve essere pianificato e riesaminato e può comprendere ad esempio l'utilizzo regolare di materiali di riferimento, la partecipazione a programmi di confronti interlaboratorio o prove valutative, la ripetizione di prove utilizzando metodi identici o differenti.

I dati di tenuta sotto controllo della qualità devono essere analizzati e, qualora si dimostrino al di fuori dei criteri predefiniti, devono essere adottate azioni pianificate per correggere il problema e per prevenire che siano prodotti risultati non corretti. Il Laboratorio Test Rapidi del CEA ha definito le modalità di monitoraggio per il Test Rapido "Idexx Herdchek BSE-SCRAPIE Antigen Kit", protocollo Ultra Short, mediante l'elaborazione di carte di controllo, che consentono di garantire l'idoneità dei risultati della prova.

Materiali e metodi

L'attenta analisi di processo ha permesso di selezionare alcuni fattori che rappresentano parametri qualitativi di performance nell'applicazione dell'IDEXX Herd Check BSE Antigen Kit EIA - Ultra Short Protocol:

- la temperatura dell'aria all'interno dell'incubatore-agitatore Grant PHMP-4, Grant Instrument Ltd, misurata mediante un termometro di prima linea;

Valori di adsorbanza relativi alla:

- media e la differenza tra le densità ottiche (D.O.) dei controlli negativi forniti dal kit;
- media delle D.O. della popolazione negativa analizzata nel corso della seduta analitica;
- deviazione standard delle D.O. della popolazione negativa analizzata nel corso della seduta analitica;

- D.O. di un campione di riferimento, omogenato in acqua al 50%, positivo per Scrapie;
- D.O. di un campione di riferimento negativo per Scrapie o per BSE.

Controllo della temperatura dell'incubatore-agitatore

Seguendo le indicazioni fornite dalla Ditta IDEXX è stata preparata una piastra, dotata di coperchio rigido, forato in corrispondenza dei pozzetti angolari esterni. Nel corso della settimana lavorativa il monitoraggio viene eseguito (sia ad inizio, sia a fine prova), a rotazione (una postazione per ogni giorno lavorativo); i limiti di controllo (LC) sono stati così determinati:

LC superiore: 37°C - incertezza estesa del termometro

LC inferiore: 32°C + incertezza estesa del termometro

Monitoraggio dei valori di adsorbanza

I parametri tenuti sotto controllo sono "lotto dipendenti"; inoltre, il monitoraggio effettuato assolve significato di allerta e non di invalidazione della prova, in quanto il Software di lettura ed interpretazione dei risultati "Magellan", ha già impostati i parametri precauzionali di sicurezza, che determinano l'invalidazione dell'analisi in caso di incongruità dei risultati di prova. Di ciascun fattore selezionato è stata studiata la dinamica e le caratteristiche intrinseche in base alle quali sono stati fissati uno o più "valori soglia di allerta", che consentono di indagare tempestivamente le cause di variazione dell'equilibrio del processo e di attuare le opportune azioni preventive e correttive.

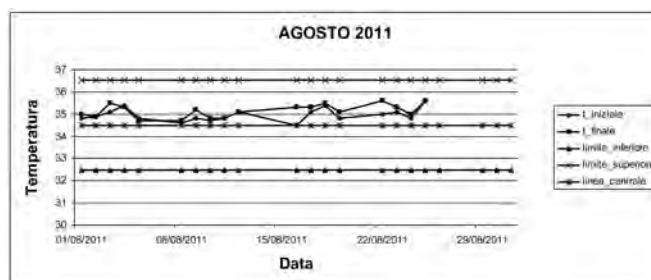
Preparazione dei campioni di riferimento

Sono stati allestiti:

- 1) un pool di campioni di SNC negativo per scrapie;
 - 2) un pool di campioni di SNC negativo per BSE;
 - 3) un pool di omogenato in acqua al 50% positivo per scrapie, dal quale è stato intenzionalmente creato, mediante diluizione scalare, un campione debolmente positivo le cui D.O. rientrano nei parametri di linearità del lettore spettrofotometrico.
- Ciascun pool è stato sottoposto a conferma diagnostica.

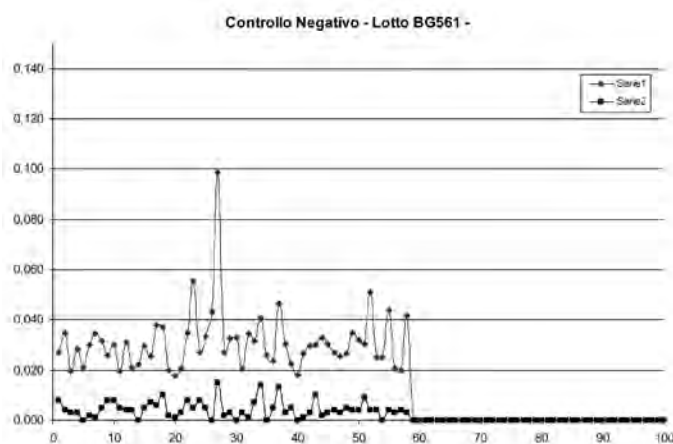
Risultati

Carta di controllo relativa alle Temperature di incubazione



Carte di controllo relative ai controlli negativi del Kit

Serie 1: Media delle D.O. dei controlli negativi
Serie 2: Deviazione nella D.O. dei controlli negativi
In ascissa: n. di piastre
In ordinata: D.O.

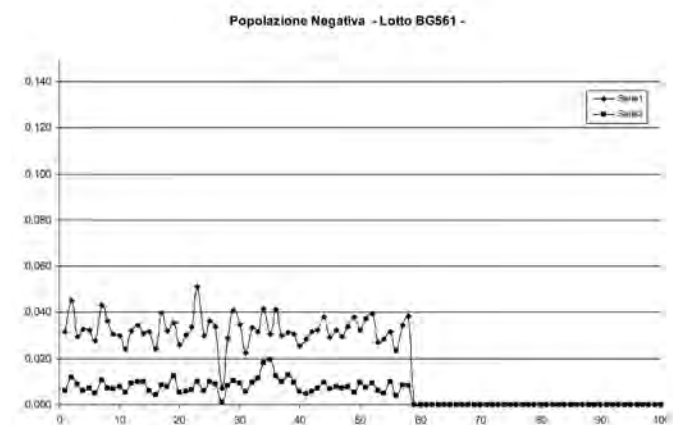


Il plottaggio della media delle D.O. dei controlli negativi consente di monitorare nel tempo l'andamento - "valore soglia di allerta": D.O. 0,120.

La differenza tra le DO dei due controlli negativi permette di verificarne la ripetibilità - "valore soglia di allerta": D.O. 0,020.

Carte di controllo relative alle D.O. della popolazione negativa

Serie 1: Media delle D.O. della popolazione negativa in piastra
Serie 2: Deviazione Standard della popolazione negativa in piastra
In ascissa: n. di piastre
In ordinata: D.O.



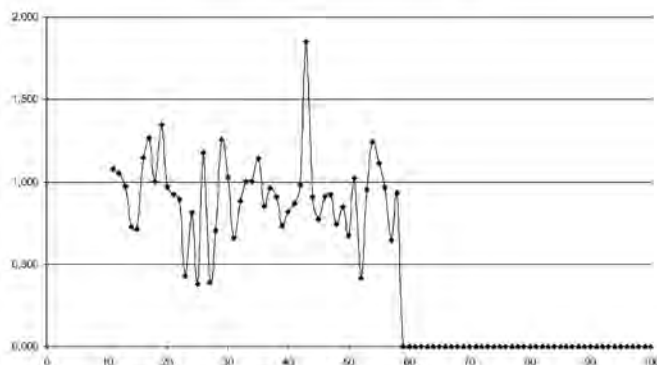
La media delle DO della popolazione negativa analizzata nel corso della seduta analitica consente di monitorare nel tempo il rumore di fondo delle piastre ed i parametri ad esso correlati - "valore soglia superiore di allerta": D.O. 0,060.

La Deviazione Standard della popolazione negativa analizzata permette di monitorare la fluttuazione delle DO nell'ambito della seduta analitica - "valore soglia di allerta": D.O. 0,020.

Carta di controllo relativa al campione di riferimento positivo

In ascissa: n. di piastre
In ordinata: D.O.

- Lotto BG561 - Controllo con SI interno POS



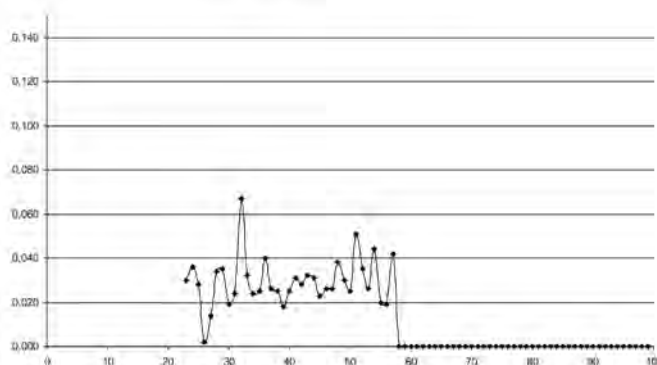
Il monitoraggio dei valori di adsorbanza di un campione debole positivo di riferimento consente di verificarne la riproducibilità nel tempo - "valore soglia inferiore di allerta" D.O. 0,300.

La fluttuazione dei valori di D.O. relativi ai pools positivi nell'ambito delle diverse prove analitiche è dovuta alla fisiologica distribuzione non uniforme della PrP patologica nell'omogenato.

Carta di controllo relativa al campione di riferimento negativo

In ascissa: n. di piastre
In ordinata: D.O.

- Lotto BG561 - Controllo con SI interno NEG



Il monitoraggio dei valori di adsorbanza di un campione di SNC negativo di riferimento permette di monitorare la riproducibilità ed i parametri ad essa correlati; consente inoltre la differenziazione di valori di D.O. generati da eventuali campioni positivi molto deboli, rientranti nei parametri di negatività del sistema - "valore soglia superiore di allerta" D.O. 0,080.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia l'Ing. Pierre Marguerat (Instrument Service IDEXX - Livestock and Poultry Diagnostics) per la paziente disponibilità ed il competente supporto tecnico offerto.

BIBLIOGRAFIA

1. UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005
2. RT-08 "Prescrizioni per l'accreditamento dei laboratori"

DIFFERENTI CONDIZIONI DI TRASPORTO NON ALTERANO LE CARATTERISTICHE DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI DI CAVALLO DESTINATE AD IMPIEGO CLINICO

Mercati F.¹, Pascucci L.¹, Ceccarelli P.¹, Dall'Aglio C.¹, Scocco P.², Marini C.³

¹Dip. di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Produzioni Animali ed Alimentari, Università di Perugia

²Scuola di Scienze Ambientali, Università di Camerino

³U.O. Immunologia – Ist. Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

Key Words: cellule staminali mesenchimali, trasporto, cavallo.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) were maintained at different temperatures for different time periods to simulate the phase of transport before their clinical use. Subsequently, MSCs were subjected to the following trials: cell viability, duplication time, Colony-Forming Unit Assay, adipogenic and osteogenic differentiation, immunophenotype, karyotype evaluation. The obtained results seem to suggest that the tested maintenance conditions are unable to induce appreciable modifications on MSCs behaviour and that the cells can be considered safe for clinical applications.

INTRODUZIONE

Nella specie equina desta un grande interesse la possibilità di utilizzare cellule staminali mesenchimali (CSM) nella cura di patologie riguardanti l'apparato locomotore quali lesioni di tendini e legamenti che, oltre ad essere molto frequenti nel cavallo sportivo, sono causa di una grave perdita economica (1, 2).

L'impiego sperimentale delle CSM può essere effettuato inoculando, direttamente a livello della lesione, cellule opportunamente preparate in laboratorio (3, 4). La fase del trapianto viene generalmente gestita dal clinico veterinario e può essere eseguita presso la scuderia dove risiede il paziente, evitando in questo modo un suo spostamento.

A causa della distanza tra il laboratorio e la scuderia, è possibile che le cellule da inoculare siano impiegate dopo un certo tempo dal momento della loro preparazione. Attualmente non esistono protocolli in cui siano indicati dei parametri di mantenimento delle CSM prima del trapianto e non è noto se durante questa "fase di attesa" le cellule possano subire delle modificazioni tali da renderle inadeguate per l'impiego clinico. Normalmente, i laboratori di ricerca possono scambiarsi le cellule coltivate *in vitro* mantenendole all'interno della propria fiasca di coltura (in monostrato o sospensione) che viene riempita di terreno di coltura, adeguatamente chiusa e spedita tramite corriere a temperatura ambiente. Per il trasferimento di CSM si verificano alcune differenze rispetto al protocollo sopra descritto: le cellule, che normalmente crescono in monostrato, sono mantenute in sospensione; il terreno di coltura è privo di Siero Fetale Bovino (onde evitare l'inoculo di una sostanza xenologa); la concentrazione cellulare è particolarmente alta. A causa di queste ultime due condizioni le cellule si trovano in un ambiente carente di sostanze nutritive.

Sulla base di queste considerazioni, abbiamo sottoposto le CSM isolate da tessuto adiposo di cavallo a differenti condizioni di conservazione. Successivamente, ne abbiamo valutato alcuni parametri cito-morfologici tipici di cellule staminali con la finalità di osservare eventuali modificazioni e, conseguentemente, stabilire le condizioni migliori di mantenimento prima di un impiego clinico.

MATERIALI E METODI

Materiali

I prodotti impiegati in questo lavoro sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo) tranne il Siero fetale bovino (SFB) e il Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM) acquistati dalla Gibco (Gaithersburg, Md).

Metodi

La procedura preliminare eseguita è quella di norma utilizzata nella preparazione di CSM destinate ad impiego in terapia cellulare (4).

Il tessuto adiposo è stato prelevato dalla regione addominale di due cavalli (1 e 3 anni di età) sottoposti ad intervento chirurgico eseguito in anestesia generale. Le cellule isolate dai campioni di tessuto adiposo sono state mantenute in coltura fino al terzo passaggio, risospese in una soluzione crio-conservante, ripartite in più fiale per consentire la ripetizione della prova e congelate in azoto liquido. Dopo lo scongelamento le cellule sono state risospese in un terreno di coltura completo (DMEM, 10% SFB, 100 U/ml penicillina, 100 µg/ml streptomycin, 12.5 µg/ml anfotericina B) e successivamente lavate più volte in terreno addizionato di antibiotici e antimicotico ma privo di SFB, in cui sono state risospese alla concentrazione di 1×10^6 cellule/ml.

Le cellule sono state suddivise in 5 aliquote e conservate come di seguito descritto: un'aliquota, considerata gruppo di controllo, è stata utilizzata subito dopo la sua preparazione (tempo 0: **T0**), due aliquote sono state mantenute per 24 ore, rispettivamente a 4°C e a temperatura ambiente (**24h-4°C**; **24h-TA**) due aliquote sono state mantenute per 48 ore, rispettivamente a 4°C e a temperatura ambiente (**48h-4°C**; **48h-TA**). La temperatura ambiente registrata variava tra 18 e 22°C.

Dopo ciascun periodo di conservazione, tutte le aliquote sono state utilizzate per le prove di seguito descritte.

Vitalità cellulare: le cellule, colorate con trypan blue, sono state contate in camera di Burker. Per ciascun gruppo è stato calcolato il valore medio di cellule vitali. **Capacità proliferativa:** le cellule sono state seminate alla concentrazione di 5-10,000 cellule/cm², mantenute in coltura per 7gg e contate per stabilire il tempo di duplicazione (DT) utilizzando le seguenti formule: $DT = CT/CD$; $CD = \ln(N_f/N_i)/\ln(2)$ (5). **Potenziale clonogenico:** Le cellule sono state seminate alla concentrazione di 1-2 cellule/cm² e mantenute in coltura per 14gg. Successivamente le colonie sono state fissate in etanolo al 95% e colorate con Giemsa. **Potenziale di differenziazione. Linea osteogenica:** dopo aver raggiunto la confluenza, le cellule sono state coltivate per 18gg in un terreno di coltura addizionato con desametasone 0.1µM, glicerolo-2-fosfato 10mM, acido ascorbico 0.2mM. Il monostrato è stato poi fissato in formalina neutra tamponata al 10% e colorato con Alizarina Red S. **Linea adipogenica:** dopo aver raggiunto la confluenza, le cellule sono state coltivate per 21gg in un terreno di coltura addizionato con

desametazone 1µM, 3-isobutil-1-metilxantina 0.5mM, insulina 10µg/ml, e indometacina 100µM. Il monostrato è stato poi fissato in formalina neutra tamponata al 10% e colorato con Oil Red O ed Ematossilina. **Fenotipo molecolare:** le cellule sono state seminate ad una densità di 5-10,000 cellule/cm² e, dopo 7gg di coltura, sono state raccolte, risospese in PBS (0,5 x 10⁶ cellule/ml) e incubate per 30' a 4°C con gli anticorpi primari anti-CD90 (mouse IgM, VMRD) e anti-CD44 (mouse IgG, AbD serotec). Dopo lavaggio in PBS, sono state incubate con i rispettivi anticorpi secondari e analizzate tramite FACS Calibur (Becton Dickinson). **Analisi quantitativa del cariotipo:** Le cellule sono state incubate per 10' a 37°C in KCl allo 0,56%, fissate in una miscela di alcool metilico e acido acetico glaciale 3:1 e colorate con Giemsa. Le piastre metafasiche sono state analizzate con il software di analisi di immagine Lucia.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Vitalità cellulare. Nei gruppi mantenuti a 4°C, sia per 24 ore che per 48 ore, non si evidenziavano differenze significative rispetto al gruppo di controllo T0. Nei gruppi mantenuti a TA, invece, si osservava una riduzione del 20% dopo 24 ore e del 24% dopo 48 ore di conservazione. Inoltre, all'osservazione in microscopia ottica, le cellule mantenute a TA presentavano, occasionalmente, una morfologia modificata caratterizzata da margini irregolari e dimensioni non uniformi. **Capacità proliferativa (DT).** I valori medi ottenuti per ciascun gruppo variavano da 1,75±0,38 a 2,09±0,42 giorni. Tali valori, tra loro molto simili, sono comparabili con quelli riportati in letteratura per CSM da tessuto adiposo di cavallo (4, 5). **Potenziale clonogenico.** In ogni prova eseguita era possibile osservare la formazione di colonie clonali caratterizzate da aspetto compatto e costituite da cellule con una tipica morfologia fibroblastoide. Non si evidenziavano differenze qualitative e/o quantitative tra i gruppi mantenuti in differenti condizioni di conservazione. **Potenziale di differenziazione.** Tutti i gruppi cellulari si sono differenziati sia verso la linea osteogenica che adipogenica. **Linea osteogenica:** i sali di calcio, evidenziati tramite Alizarina Red S, erano localizzati a livello di aggregati cellulari che si erano formati sul monostrato cellulare. Tali aggregati presentavano dimensioni differenti e un tipico aspetto nodulare. **Linea adipogenica:** La positività all'Oil Red O era chiaramente visibile a livello di vacuoli citoplasmatici di vario numero e dimensioni. In entrambi i casi le cellule del controllo negativo, coltivate in un terreno di coltura privo di sostanze induttrici, erano cresciute formando un monostrato fortemente compatto ma privo di aggregati cellulari ed erano tutte negative alla colorazione con Alizarina Red S o con Oil Red O. **Fenotipo molecolare.** **CD90:** confrontando i valori medi ottenuti per ciascun gruppo testato, abbiamo osservato una lieve ma progressiva riduzione della popolazione cellulare positiva passando dal gruppo T0, ai gruppi conservati fino a 48 ore. **CD44:** abbiamo ottenuto una riduzione del valore medio della popolazione positiva solamente per le cellule conservate fino a 48 ore (sia a 4°C che a TA) mentre le cellule conservate fino a 24 ore non presentavano differenze rispetto al controllo T0. **Analisi quantitativa del cariotipo:** il numero dei cromosomi è risultato normale per tutti i gruppi cellulari testati.

La conta cellulare, eseguita subito dopo la fase di conservazione, è una prova finalizzata a stabilire il numero di cellule che rimangono vitali e che sarà effettivamente

inoculato nel soggetto ricevente. Le altre indagini eseguite consentono, invece, di capire se le cellule vitali hanno mantenuto le caratteristiche tipiche di staminalità e se hanno subito o meno alterazioni tali da impedire un loro impiego clinico. Prima di eseguire queste prove (capacità proliferativa, potenziale clonogenico, potenziale di differenziazione, ecc.) le cellule, dopo il periodo di conservazione, sono state poste nuovamente in coltura: tale passaggio permette di valutare la capacità di ripresa metabolica delle cellule simulando quello che può avvenire in seguito ad inoculo nel tessuto lesionato. I risultati ottenuti, valutati in modo complessivo, ci consentono di dire che la popolazione cellulare da noi testata è una popolazione piuttosto stabile che non risente in modo significativo delle condizioni di conservazione cui è stata sottoposta. La temperatura e il tempo di conservazione sono parametri che devono essere considerati al fine di inoculare un'adeguata quantità di cellule, tuttavia le cellule vitali si adattano nuovamente alle condizioni colturali dimostrando una attività metabolica normale e caratteristiche tipiche di cellule staminali. La popolazione positiva agli antigeni di superficie CD44 e CD90 tende leggermente a diminuire nei gruppi conservati fino a 48 ore. Di particolare importanza è la stabilità delle cellule accertata tramite valutazione del numero dei cromosomi che rimane inalterato.

Sulla base di questi risultati, è possibile concludere che la terapia cellulare eseguita con cellule preparate entro le 24h può essere considerata sicura mentre è preferibile non protrarre oltre questo limite i tempi di attesa. È consigliato, inoltre, trasportare le cellule alla temperatura di 4°C, onde evitare una eccessiva riduzione del numero di cellule vitali.

BIBLIOGRAFIA

1. Koch TG, Berg LC, Betts DH. (2009) Current and future regenerative medicine — Principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. *Can Vet J*; 50:155-165.
2. Richardson LE, Dudhia J, Clegg PD, Smith R. (2007) Stem cells in veterinary medicine-attempts at regenerating equine tendon after injury. *Trends Biotechnol*; 25(9):409-16.
3. Godwin EE, Young NJ, Dudhia J, Beamish IC, Smith R. (2011) Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon. *Equine Vet J* (In press).
4. Pascucci L, Mercati F, Marini C, Dall'aglio C, Marenzoni ML, Ceccarelli P. (2011) Allestimento di una banca di cellule staminali mesenchimali (CSM) da tessuto adiposo di cavallo da impiegare in trapianti allogenici: effetti della crioconservazione sulla morfologia cellulare, sulla crescita in coltura e sull'efficacia clinica. Banking horse adipose-derived mesenchymal stem cells for allogeneic transplantation: how cryoconservation affects cell morphology, cultural features and in vivo efficacy. *Ippologia*; 22(1):15-22.
5. Vidal MA, Kilroy GE, Lopez MJ, Johnson JR, Moore RM, Gimble JM. (2007) Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Vet Surg*; 36(7):613-22.

VALUTAZIONE DI GENI DI RIFERIMENTO PER L'ANALISI DI ESPRESSIONE GENICA TRAMITE REALTIME qPCR IN CELLULE SOMATICHE DEL LATTE DI CAPRA

Modesto P.¹, Peletto S.¹, Pisoni G.², Cremonesi P.³, Castiglioni B.³, Colussi S.¹, Moroni P.², Bronzo V.², Acutis P. L.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna 148, Torino, Italy

²Dipartimento di Patologia animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Milano, Via Celoria 10, Milano, Italy

³CN-IBBA UOS di Lodi, Via Einstein Lodi, Italy

Key words: geni di riferimento, *Capra hircus*, cellule somatiche del latte

Summary

The objective of this study was to develop a set of reference genes for normalizing qRT-PCR data from Milk Somatic Cells (MSCs) useful to identify specific markers associated with complex infectious diseases, such as mastitis. We monitored goats during experimental *Staphylococcus aureus* exposure by collecting milk samples before the inoculum and at 24 and 30 hours *post* infection. According to NormFinder software the most stable gene in all sample groups was *G6PD* and the best gene combination was *G6PD* and *YWHAZ*.

Introduzione

Lo studio dell'espressione genica nelle cellule somatiche del latte (milk somatic cells, MSCs) può essere utile per indagare l'attività trascrizionale della ghiandola mammaria di un animale in relazione al suo stato patologico, al suo genotipo, e all'influenza di fattori ormonali. La PCR quantitativa (qRT-PCR) è il metodo di scelta per ottenere una corretta quantificazione dei trascritti di mRNA. L'utilizzo di geni di riferimento interni è l'approccio più largamente condiviso e considerato affidabile per normalizzare i risultati di qRT-PCR e ridurre gli errori conseguenti a variazioni sperimentali. Nella specie caprina, la valutazione di specifici geni di riferimento è stata descritta solo per l'analisi di follicoli preantrali (5) e di tessuto mammario (4), altri studi di espressione genica sono stati condotti in diversi tessuti e cellule (condrociti, cellule del sistema nervoso centrale, cellule somatiche del latte, cellule germinali) senza una valutazione dei geni di riferimento idonei, ma scegliendoli in modo arbitrario tra quelli comunemente utilizzati in letteratura (6, 7, 8).

Obiettivo del presente lavoro è stato individuare un pannello di geni di riferimento utili alla normalizzazione dei dati di qPCR per l'analisi di MSCs di capre in condizioni fisiologiche ed in corso di infezione mammaria sostenuta da *Staphylococcus aureus*. Gli stafilococchi sono considerati i più importanti agenti eziologici di mastite nelle capre (1); tra questi *S. aureus* è il patogeno più importante ed è responsabile di infezione intramammaria cronica, subclinica e in alcuni casi di mastite clinica e gangrenosa.

Durante lo studio sono stati disegnati 10 saggi PCR per i geni di riferimento più comunemente utilizzati, appartenenti a diverse classi funzionali e la loro stabilità di espressione nelle MSCs di capra è stata valutata e classificata tramite il software Normfinder che permette di analizzare gruppi di campioni (ad esempio sani ed infetti) per identificare il gene con la stabilità intergruppo più elevata. Tutti gli esperimenti sono stati condotti secondo quanto prescritto nelle "Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) guidelines" (2).

Materiali e Metodi

I campioni di latte sono stati raccolti da 10 capre sane (time point 0=T0) e successivamente dagli stessi animali a 24 ore (time point 1=T1) e 30 ore (time point 2=T2) dall'infezione

sperimentale della mammella sinistra con una sospensione di 10³ CFU di *S. aureus*. Per ogni soggetto è stato raccolto tutto il latte prodotto dalla ghiandola mammaria. Dopo step successivi di centrifugazione e lavaggio i pellet di cellule sono stati risospesi in 3-5 ml di Trizol (Invitrogen). L'RNA totale è stato estratto dalla sospensione contenente circa 10⁶ MSCs secondo il protocollo fornito dal produttore. L'RNA è stato quindi analizzato tramite Agilent Bioanalyzer 2100 per la quantificazione e la valutazione di integrità e purezza, quindi 500 ng di RNA totale sono stati retrotrascritti con il kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen). Sono stati selezionati 10 geni coinvolti nel metabolismo cellulare essenziale e comunemente utilizzati come geni di riferimento nell'analisi di espressione genica in qRT-PCR (Tabella 1). Per l'amplificazione dei geni *SDHA*, *G6PD*, *TBB* e *RNA18S* sono stati utilizzati primer già descritti in letteratura (3, 5). Per i rimanenti geni, sono stati disegnati primer specifici tramite il software Primer3 dopo allineamento delle sequenze caprine disponibili in GenBank con geni omologhi di bovino e ovino. I primer sono stati selezionati affinché il frammento amplificato fosse esteso su diversi esoni e permettesse la distinzione, attraverso l'analisi della curva di melting, dell'amplificazione aspecifica del DNA genomico. PCR preliminari su cDNA e DNA caprino sono state condotte per verificare la specificità dei primer. Le reazioni sono state eseguite in 25 µl utilizzando 2x QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen), 600 nM di ogni primer e 2 µl di cDNA. Le analisi PCR sono state condotte su strumento Mx3005P QPCR System (Stratagene). Per ogni gene testato, l'efficienza di PCR è stata determinata tramite curve standard derivate da pool di cDNA. Per la valutazione della stabilità di espressione intergruppo del set di geni di riferimento è stato utilizzato l'applicativo NormFinder v.20. Prima dell'analisi i valori di quantificazione (Ct) sono stati convertiti in quantità relative tramite il metodo del Ct comparativo.

Tabella 1. Set di geni di riferimento candidati testati nello studio

Simbolo	Gene Name
<i>ACTB</i>	β -actina
<i>TBB</i>	β -tubulina
<i>GAPDH</i>	gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi
<i>G6PD</i>	glucosio-6- fosfato deidrogenasi
<i>PGK1</i>	fosfoglicerato chinasi I
<i>RNA18S</i>	RNA ribosomale 18S
<i>RPL13A</i>	proteina ribosomale L13a
<i>SDHA</i>	complesso succinato deidrogenasi, subunità A, flavoproteina
<i>TFRC</i>	recettore transferrina
<i>YWHAZ</i>	tirosina 3-monoossigenasi

RISULTATI E DISCUSSIONE

NormFinder ordina il pannello di geni candidati secondo la misura della loro stabilità (ρ) basandosi sulla similarità dei profili di espressione in un set di campioni in un dato disegno sperimentale, ai geni più stabili vengono assegnati valori di ρ più bassi. L'algoritmo utilizzato è in grado di valutare non solo la variabilità di espressione totale ma anche le variazioni tra sottogruppi di campioni (per esempio sani ed infetti).

La tabella 2 riporta i risultati ottenuti dall'analisi con NormFinder. *G6PD* è il gene più stabile nei campioni provenienti sia da animali sani sia con infezione in corso, la migliore combinazione di due geni di riferimento è data da *G6PD* e *YWHAZ*.

Considerando i campioni raccolti nei diversi time point, *G6PD* risulta tra i geni più stabili, occupando il secondo o il terzo posto nella classificazione di NormFinder (Tabella 3). Dal momento che, per la specie caprina, è la prima volta che il gene *G6PD*

viene coinvolto in uno studio di valutazione dei geni di riferimento, non è possibile effettuare confronti con lavori precedenti. Geni stabili tra i gruppi risultano anche *ACTB* e *YWHAZ*, mentre *TBB*, pur risultando il gene più stabile nei campioni raccolti in corso di infezione, non dimostra elevata stabilità dei campioni sani. In tutti i gruppi considerati, geni poco stabili risultano *RPL13A* e *RNA18S*, quest'ultimo è riportato essere il meno stabile anche nei follicoli preantrali (5), mentre è risultato il gene più stabile nel tessuto mammario (4). Le maggiori variazioni di espressione nei geni del set considerato sono state rilevate per *PGK1* e *TFRC* (Grafico 1). Questo studio fornisce un pannello di geni di riferimento interni che possono risultare utili nell'identificazione tramite qRT-PCR di geni differentemente espressi in MSCs di capra e che potenzialmente possono essere utilizzati nella valutazione di marker specifici associati a malattie infettive complesse come la mastite.

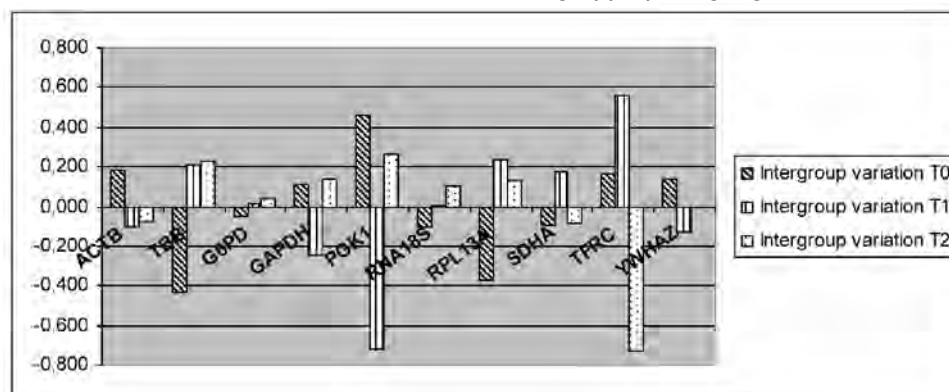
Tabella 2. Classificazione dei geni di riferimento in base alla loro stabilità nei tre gruppi di campioni studiati secondo il software NormFinder

Gene	Valore di stabilità (ρ)
G6PD	0,170
<i>YWHAZ</i>	0,241
<i>ACTB</i>	0,260
<i>SDHA</i>	0,304
<i>RNA18S</i>	0,326
<i>GAPDH</i>	0,375
<i>TBB</i>	0,381
<i>RPL13A</i>	0,492
<i>TFRC</i>	0,598
<i>PGK1</i>	0,626

Tabella 3. Classificazione dei geni di riferimento in base alla loro stabilità di espressione per gruppo

Campioni T0		Campioni T1		Campioni T2	
Gene	Valore di stabilità (ρ)	Gene	Valore di stabilità (ρ)	Gene	Valore di stabilità (ρ)
<i>ACTB</i>	0,036	TBB	0,040	<i>TBB</i>	0,034
<i>YWHAZ</i>	0,037	<i>G6PD</i>	0,061	<i>G6PD</i>	0,191
<i>G6PD</i>	0,073	<i>TFRC</i>	0,113	<i>ACTB</i>	0,212
<i>SDHA</i>	0,099	<i>ACTB</i>	0,154	<i>YWHAZ</i>	0,222
<i>TBB</i>	0,212	<i>YWHAZ</i>	0,202	<i>TFRC</i>	0,295
<i>PGK1</i>	0,262	<i>SDHA</i>	0,264	<i>GAPDH</i>	0,363
<i>GAPDH</i>	0,278	<i>RNA18S</i>	0,536	<i>SDHA</i>	0,463
<i>TFRC</i>	0,302	<i>GAPDH</i>	0,592	<i>RNA18S</i>	0,548
<i>RNA18S</i>	0,333	<i>RPL13A</i>	0,680	<i>RPL13A</i>	1,319
<i>RPL13A</i>	0,384	<i>PGK1</i>	1,466	<i>PGK1</i>	1,536

Grafico 1. Variazione dei valori di stabilità intergruppo per ogni gene di riferimento



BIBLIOGRAFIA:

1. Bergonier D., De Crémoux R., Rupp R., Lagriffoul G., Berthelot X. Mastitis of dairy small ruminants, 2003. *Vet. Res.* 34 689–716
2. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55, 611-22
3. Garcia-Crespo D., Juste R.A., Hurtado A., 2005. Selection of ovine housekeeping genes for normalisation by real-time RT-PCR; analysis of PrP gene expression and genetic susceptibility to scrapie. *BMC Veterinary Research* 28, 1-3
4. Finot L., Marnet PG., Dessauge F., 2011. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization: application in the caprine mammary gland. *Small ruminant research* (95):20-26
5. Frota I. M., Leitão C. C., Costa J. J., Brito I. R., Van den Hurk R. and Silva J. R, 2011. Stability of housekeeping genes and expression of locally produced growth factors and hormone receptors in goat preantral follicles. *Zygote*,19(1):71-83
6. Pisoni G., Moroni P., Genini S., Stella A., Boettcher PJ, Cremonesi P, Scarabozzi L., Giuffra E., Catiglioni B.. 2010. Differentially expressed genes associated with *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy goats. *Vet immunol immunopathol* 15; 135(3-4):208-17
7. Ren Y., Wang Q., Shi L., Yue W., Zhang C., Lei F. 2011. Effects of maternal and dietary selenium (Se-enriched yeast) on the expression of p34cdc2 and CyclinB1 of germ cells of their offspring in goats. *Animal Reproduction Science* 123 187–191
8. Vonk L.A., Kroeze R.J., Doulabi B.Z., Hoogendoorn R.J., Huang C.L., Helder M.N., Everts V., Bank R.A., 2010. Caprine articular, meniscus and intervertebral disc cartilage: an integral analysis of collagen network and chondrocytes. *Matrix Biology* (29): 209–218.

Ringraziamenti: questo studio è stato finanziato dal Ministero della salute nell'ambito del progetto: "Progetto di Ricerca Corrente 2009" (Research Project code IZSPLV 06/09RC).

INDAGINE SULLA SENSIBILITÀ AGLI ANTIMICROBICI DI CEPPI DI *PASTEURELLA MULTOCIDA* ISOLATI IN CORSO DI PASTEURELLOSI IN DIVERSE SPECIE ANIMALI

Ortenzi R.¹, Cucco L.¹, Mangili P.¹, Cocchi M.², D'Angelo G.¹, Sebastiani C.¹, Magistrali C. F.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche (IZSUM) - Perugia

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVE)- Sezione di Udine

Keywords: *Pasteurella multocida*, antibiotico resistenza, fattori di virulenza

SUMMARY

The aim of this study was to investigate the antimicrobial susceptibility of *P. multocida* isolates from different animal species affected by Pasteurellosis. For this purpose, 193 strains, typed for capsular antigens and major toxins by PCR, were analyzed by disk test diffusion according to the CLSI M31-A2 method. Susceptibility to most antimicrobials was above 90%, except for erythromycin and tylosin; 9 isolates showed resistance to more than three antimicrobials; moreover, a low level of resistance to fluoroquinolones (3%) and ceftiofur (8%) was detected.

INTRODUZIONE

Pasteurella multocida è commensale delle prime vie respiratorie di molte specie animali, ma è anche agente causale di forme morbose quali la setticemia emorragica del bovino, la broncopneumonia enzoootica del bovino e dell'ovino, la polmonite e la rinite atrofica del suino, il colera aviario, la rinite del coniglio, del cane e del gatto, la mastite, la polmonite, la piodermite e la pasteurellosi setticemica del coniglio. La patogenicità di *P. multocida* si è dimostrata essere legata sia alla presenza della capsula (4), che a quella dei fattori di virulenza (5); esiste inoltre una correlazione, anche se non esclusiva, tra sierotipo capsulare, ospite e patologia riscontrata. La pasteurellosi nelle sue diverse espressioni cliniche si riscontra con frequenza negli allevamenti intensivi provocando ingenti danni economici diretti e indiretti. Negli allevamenti intensivi, il contenimento dei danni causati da questa infezione si affida ancora prevalentemente alla terapia antimicrobica (6). Recentemente tuttavia, sono state descritte resistenze verso alcuni antimicrobici, ad esempio all'ampicillina e alla carbenicillina in ceppi di *P. multocida* di origine aviaria e multi resistenze in ceppi isolati da suini in Spagna e in Cina (5,7).

Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare la sensibilità agli antimicrobici di ceppi di *P. multocida* isolati in corso di pasteurellosi in diverse specie animali provenienti da contesti territoriali differenti; tali ceppi erano caratterizzati per sierotipo capsulare e presenza di geni codificanti per le principali tossine.

MATERIALI E METODI

Sono stati testati 193 ceppi di *P. multocida* di origine diversa (bovino 39, ovino 19, suino 40, conigli 88, gatto 3, equino 1, tacchino 1, lepri 2), collezionati dal 2004 al 2011 nell'ambito dell'attività diagnostica dell'IZSUM e di altri Istituti Zooprofilattici. I ceppi, conservati alla temperatura di -80°C, sono stati inoculati in Brain Heart Infusion (BHI) e incubati a 37°C per 24 ore; 10 µL della sospensione ottenuta sono stati trasferiti in Agar Sangue (5% globuli rossi di montone) per ottenere, dopo 24 ore di incubazione a 37°C, delle colonie isolate. I ceppi erano stati caratterizzati mediante due protocolli di PCR multiplex per la tipizzazione degli antigeni capsulari e la ricerca

di alcuni geni di virulenza: *hgbB* (Hemoglobin binding protein); *pfhA* (Filamentous hemagglutinin), *tbpA* (Transferrin binding protein) e *toxA* (Dermonecrotic toxin) (1,3).

Dalle colonie isolate è stato allestito il test per la determinazione della sensibilità agli antimicrobici mediante diffusione in agar, secondo il metodo CLSI 2002 (M31- A2) (8). Il pannello di antibiotici testati includeva: ampicillina, amoxicillina+ac. clavulanico, ceftiofur, enrofloxacin, flumequine, florfenicolo, tetraciclina, sulfametossazolo+trimetoprim, gentamicina, amminosidina, eritromicina, tilosina e tilmicosina.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I dati di sensibilità degli stipiti di *P. multocida* evidenziati dal presente lavoro, confermano, come già riportato in letteratura, la buona sensibilità di questo batterio nei confronti dei principali antimicrobici (tabella 1). Le eccezioni in quest'ambito sono costituite da eritromicina e tilosina, che rappresentano i fenotipi di resistenza più frequentemente riscontrati. Cefalosporine florfenicolo e fluorochinoloni sono stati indicati come i farmaci più attivi nei confronti delle infezioni da *P. multocida* (5).

Nonostante i valori di sensibilità nei confronti di questi antimicrobici si collochino ancora al di sopra del 90%, preoccupa il rilievo di stipiti resistenti al ceftiofur e ai fluorochinoloni. Tutti i ceppi si sono dimostrati sensibili nei confronti del florfenicolo. Analizzando i dati riferiti alla sola specie bovina (tabella 2) e suina (tabella 3), è possibile osservare come le percentuali di ceppi sensibili siano generalmente inferiori rispetto a quelli riportati in tabella 1. Per il bovino, sono disponibili in letteratura dati riferiti al 2003 per l'Italia (2), relativi agli antimicrobici ampicillina, amoxicillina e acido clavulanico, fluorochinoloni, florfenicolo, tetraciclina e sulfametossazolo+trimetoprim. Per tutti gli antimicrobici, ad eccezione di florfenicolo e tetraciclina, i dati italiani riferiti al 2003 presentano percentuali di sensibilità superiori rispetto a quelli del presente lavoro. A differenza di bovino e suino, i dati di sensibilità relativi al coniglio mostrano percentuali uguali o superiori a quelli riportate in tabella 1.

Per quanto riguarda la presenza di stipiti poli-antibiotico-resistenti, 9 ceppi hanno mostrato un numero di resistenze pari o superiori a 3; questi erano di origine bovina (5), suina (4) e ovina (1). Nel bovino si sono registrate fino a 7 resistenze in un unico ceppo. Gli isolati erano stati classificati per l'appartenenza al tipo capsulare (A, D, B, F) ed alcune tossine. Nello specifico, per quanto riguarda la tipizzazione capsulare, 142 ceppi sono risultati positivi per capA, 2 per cap B, 26 per cap D e 23 per cap F; invece, per quanto concerne i fattori di virulenza, 92 isolati possedevano il gene *hgbB*, 98 il gene *pfhA*, 48 il gene *tbpA* e infine 9 il gene *toxA*. La sensibilità agli antimicrobici relativi al solo tipo capsulare A ed alle tossine *hgbB* e *pfhA*, per i quali il numero di isolati era più consistente, sono descritte in tabella 4. Dai nostri dati, non emergono evidenti correlazioni tra il tipo capsulare A e le positività per *hgbB* e *pfhA* e la presenza di resistotipi specifici. Questo è verosimilmente attribuibile alla

grande eterogeneità dei ceppi esaminati, in termini di specie di origine, forma clinica e provenienza geografica.

Concludendo, la sensibilità agli antimicrobici di *P.multocida* risulta essere buona, ad eccezione di tilosina ed eritromicina. Ciononostante, si è registrata una riduzione della sensibilità verso alcuni antimicrobici e la comparsa di resistenze verso molecole chiave, in particolare nel bovino e nel suino, che potrebbero essere attribuite alla pressione selettiva generata dal frequente ricorso a terapie antibiotiche. Questo, unitamente alla presenza di stipiti poli-antibiotico-resistenti, deve suggerire prudenza nell'approccio terapeutico alle pasteurellosi.

Tab. 1 Sensibilità agli antimicrobici riferiti a tutti gli isolati (tra parentesi i valori in percentuale)

	S	I	R
Amoxicillina+a.clav	188 (97)	2 (1)	3 (2)
Ampicillina	171 (89)	16 (8)	5 (3)
Ceftiofur	181 (94)	4 (2)	8 (4)
Aminosidina	186 (96)	1 (1)	6 (3)
Gentamicina	180 (93)	7 (4)	5 (3)
Enrofloxacin	183 (95)	8 (4)	2 (1)
Flumequine	182 (94)	8 (4)	3 (2)
Eritromicina	62 (32)	124 (64)	7 (4)
Tilosina	77 (40)	45 (23)	71 (37)
Tilmicosina	185 (95)	3 (2)	5 (3)
Florfenicolo	193 (100)	0 (0)	0 (0)
Sulfametossazolo+T	174 (90)	4 (2)	15 (8)
tetraciclina	172 (89)	4 (2)	17 (9)

Tab. 2 Sensibilità agli antimicrobici in bovino (tra parentesi i valori in percentuale).

	S	I	R
Amoxicillina+a.clav	38 (97)	1 (3)	0 (0)
Ampicillina	35 (90)	3 (8)	1 (3)
Ceftiofur	36 (92)	0 (0)	3 (8)
Aminosidina	35 (90)	1 (3)	3 (8)
Gentamicina	35 (90)	1 (3)	3 (8)
Enrofloxacin	35 (90)	3 (8)	1 (3)
Flumequine	32 (82)	4 (10)	3 (8)
Eritromicina	13 (33)	22 (56)	4 (10)
Tilosina	7 (18)	9 (23)	23 (59)
Tilmicosina	37 (95)	0 (0)	2 (5)
Florfenicolo	39 (100)	0 (0)	0 (0)
Sulfametossazolo+T	33 (85)	1 (3)	5 (13)
Tetraciclina	30 (77)	2 (5)	7 (18)

Tab. 2 Sensibilità agli antimicrobici nel suino (tra parentesi i valori in percentuale).

	S	I	R
Amoxicillina+a.clav	37 (93)	0 (0)	3 (8)
Ampicillina	35 (88)	0 (0)	4 (10)
Ceftiofur	34 (85)	3 (8)	3 (8)
Aminosidina	38 (95)	0 (0)	2 (5)
Gentamicina	38 (95)	2 (5)	0 (0)
Enrofloxacin	39 (98)	1 (3)	0 (0)
Flumequine	39 (98)	1 (3)	0 (0)
Eritromicina	10 (25)	29 (73)	1 (3)
Tilosina	21 (53)	5 (13)	14 (35)
Tilmicosina	38 (95)	1 (3)	1 (3)
Florfenicolo	40 (100)	0 (0)	0 (0)
Sulfametossazolo+T	32 (80)	2 (5)	6 (15)
Tetraciclina	34 (85)	1 (3)	5 (13)

Tab. 3 Sensibilità agli antimicrobici nel coniglio (tra parentesi i valori in percentuale).

	S	I	R
Amoxicillina+a.clav	87 (99)	1 (1)	0 (0)
Ampicillina	75 (85)	13 (15)	0 (0)
Ceftiofur	87 (99)	1 (1)	0 (0)
Aminosidina	87 (99)	0 (0)	1 (1)
Gentamicina	83 (94)	3 (3)	1 (1)
Enrofloxacin	85 (97)	2 (2)	1 (1)
Flumequine	85 (97)	3 (3)	0 (0)
Eritromicina	31 (35)	56 (64)	1 (1)
Tilosina	38 (43)	28 (32)	22 (25)
Tilmicosina	84 (96)	2 (2)	2 (2)
Florfenicolo	88 (100)	0 (0)	0 (0)
Sulfametossazolo+T	83 (94)	1 (1)	4 (5)
Tetraciclina	83 (94)	1 (1)	4 (5)

Tab. 4 Sensibilità agli antimicrobici associata a cap A (tipo capsulare A) ed alle tossine hgbB e pfhA (valori espressi come percentuale sul totale dei positivi per ciascun fattore).

	Cap A	hgbB	pfhA
Amoxicillina+a.clav	97%	98%	95%
Ampicillina	87%	88%	88%
Ceftiofur	92%	90%	95%
Aminosidina	96%	99%	93%
Gentamicina	94%	92%	92%
Enrofloxacin	95%	94%	95%
Flumequine	94%	97%	89%
Eritromicina	36%	25%	39%
Tilosina	44%	40%	38%
Tilmicosina	98%	96%	95%
Florfenicolo	100%	100%	100%
Sulfametossazolo+T	87%	94%	87%
Tetraciclina	89%	89%	84%

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- 1) Atashpaz S., Shayegh J., Hejazi M. S. (2009) "Rapid virulence typing of *Pasteurella multocida* by multiplex PCR" Res Vet Sci 87: 355-357
- 2) Hedriksen, R.S. et al. (2008) "Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002-2004". Acta Veterinaria Scandinavica 50: 28.
- 3) Kirsty M., Townsend, John D. Boyce, Jing J. Chung, Alan J. Frost, Ben Adler (2001) "Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system" J Clin Microbiol 39: 924-929
- 4)) Harper M., Boyce J.D., Adler B. (2006) "Pasteurella multocida pathogenesis: 125 years after Pasteur" FEMS Microbiol Lett. 265: 1-10
- 5) Tang X., Zhao Z., Hu J., Wu B., Cai X., He Q., Chen H. (2009) "Isolation, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China" J Clin Microbiol 47: 951-958
- 6) Sellyei B., Varga Z., Szentesi-Samu K., Kaszanyttzky M., Magyar T. (2009) "Antimicrobial susceptibility of *Paseurella multocida* isolated from swine and poultry" Acta Veterinaria Hungarica 57: 357-367.
- 7) San Millan A., Escudero J.A. Gutierrez B., Hidalgo L., Garcia N., Llagostera M., Dominguez L., Gonzalez-Zorn B. (2009) "Multiresistance in *Paseurella multocida* is mediated by coexistence of small plasmids" Antimicrobial Agents and Chemotherapy 53:3399-3404.
- 8) CLSI (ex NCCLS), 2002. M31-A2. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard W W

RESPONSABILITA' DEI NEONICOTINOIDI NELLE MORIE DI API IN PROVINCIA DI BIELLA

**Parisani V.¹, Barbaro A.¹, Vitale N.¹, D'Errico V.¹,
Chiavacci L.¹, Rosso A.², Brusa B.², Palma A.², Mogliotti P.²**

¹ S.S. Osservatorio Epidemiologico, I.Z.S. del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

² Centro Apistico Regionale, I.Z.S. del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, sezione di Asti

Parole chiave: Neonicotinoidi, api, LC/MS

Keywords: Neonicotinoids, bees, LC/MS

SUMMARY

The current decline being witnessed in Honey bees have been attributed to a number of possible factors. Central to the global debate are neonicotinoid pesticides: this work aims to demonstrate how these pesticides have been linked to bee declines.

Honey bees that died during the trials, collected from 6 apiaries located in Piedmont area, were analyzed for neonicotinoids residues with LC/MS method.

The results show 8 honeybee samples positive on neonicotinoids (clothianidin) residues (total of 80 samples).

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni, e in particolare tra il 2005 e il 2009, si sono verificate nel mondo numerose morie anomale di api. Le segnalazioni di mortalità o di spopolamento degli alveari da parte degli apicoltori sono state di fondamentale importanza per l'identificazione e la quantificazione delle morie sul territorio, ed hanno permesso di investigare, attraverso analisi specifiche di laboratorio, circa il riconoscimento dei contaminanti ritenuti pericolosi.

Le api possono venire in contatto con i contaminanti ambientali in vari modi: possono essere investite direttamente da un trattamento antiparassitario, oppure raccogliere nettare e polline sui fiori di piante coltivate o contaminate, oppure attraverso la guttazione.

Una delle ipotesi formulate negli ultimi anni sulle morie di api chiama in causa l'utilizzo in agricoltura di agrofarmaci di nuova generazione, come i neonicotinoidi (1).

I neonicotinoidi possiedono una buona attività insetticida nei confronti di insetti predatori, fitofagi e zoofagi, e risultano efficaci anche sugli insetti resistenti ad altri gruppi chimici. Per questo motivo hanno un vasto impiego nella protezione delle colture, con applicazioni nella concia delle sementi di mais, del cotone, del colza, della barbabietola e del girasole, nei trattamenti fogliari di molti fruttiferi e di piante ornamentali e trattamenti granulari al terreno. Inoltre sono dotati di buona attività sistemica all'interno delle piante, perché possono essere assorbiti dalle radici, dal fusto e dalle foglie ed essere traslocati attraverso la linfa in tutti gli organi vegetali.

I neonicotinoidi sono agonisti dell'acetilcolina, e si sostituiscono ad essa legandosi in modo irreversibile ai recettori nicotinici (nAChRs) localizzati a livello delle sinapsi tra due neuroni. Tale processo provoca l'alterazione della trasmissione degli impulsi nervosi.

Questi agrofarmaci risultano particolarmente pericolosi per le api (Tabella 1), nelle quali provoca un'intossicazione acuta per contatto o per ingestione quando raccolgono nettare, acqua o pollini contaminati, la quale determina, conseguentemente, la paralisi e la morte dell'insetto (2).

Tabella 1. Dosi letali di neonicotinoidi (3)

Neonicotinoide	LD50 (acuta) per ingestione in 48h	LD50 (acuta) per contatto
Acetamiprid	14,53 µg/ape	8,09 µg/ape
Clothianidin	3,79 ng/ape	4,43 ng/ape
Imidacloprid	5 ng/ape	17,9 ng/ape
Thiacloprid	17,32 µg/ape	38,82 µg/ape
Thiamethoxam	5 ng/ape	24 ng/ape

Sono anche possibili intossicazioni croniche: in questo caso, l'ape viene a contatto con dosi subletali di contaminante che determinano effetti fisiologici (dovuti all'interazione con i recettori nicotinici) e comportamentali. Per bassissimi dosaggi si osservano una diminuzione dei movimenti dell'ape, alterazioni della navigazione e dell'orientamento. Infatti, è stato dimostrato che le api, una volta contaminate con questi principi attivi, acquisiscono in maniera sfalsata le immagini perdendo totalmente o in parte l'orientamento: ciò le porta a vagare senza riuscire più a ritornare all'apiario (4).

MATERIALI E METODI

La zona interessata dall'indagine è stata studiata dal punto di vista dell'uso del suolo e della composizione agricola, attraverso mappe colturali, che rappresentano un valido strumento per scegliere dove collocare gli alveari per la rete di monitoraggio, considerando anche che ogni stazione copre un'area di circa 7 Km² (5).

Poiché i neonicotinoidi vengono utilizzati per la concia delle sementi, che consiste nel rivestire il seme da piantare con una pellicola contenente una certa dose di fitofarmaco, si è scelto di disporre le stazioni di monitoraggio nelle vicinanze di campi coltivati.

In base a queste considerazioni, le 6 stazioni di monitoraggio sono state collocate dal Servizio di Sanità Pubblica Veterinaria dell'ASL delle provincia di Biella nei comuni di Biella, Bioglio, Donato, Mottalciata, Salussola e Zubiena.

Ogni stazione è formata da due arnie Dadant-Blatt standard, composte di dieci-dodici telaini di famiglie di api in buono stato di salute e sottoposte alle profilassi previste dai piani regionali territoriali nei confronti delle più comuni malattie (varroasi e nosemiasi). Gli alveari sono dotati di gabbie (tipo underbasket Gary) per la raccolta di api morte e provviste di una apposita copertura.

I campionamenti sono stati effettuati nel periodo maggio 2008 – agosto 2010.

È stato studiato e messo a punto un metodo per la determinazione di neonicotinoidi su campioni di api rinvenute morte. L'analisi viene effettuata attraverso un cromatografo ad alte prestazioni con un rivelatore spettrometrico di massa a trappola ionica.

Dal campione, costituito da 20 g di api morte, si pesa una quantità pari a $2,5 \pm 0,5$ g in provette da 50 mL tipo Falcon, alla quale viene aggiunta una miscela organica; dopo aver agitato su bagno ad ultrasuoni per 10 minuti, e con agitatore oscillante per altri 20 minuti, si filtra su cotone in colonna e si porta a secco in corrente di azoto. Aiutandosi con un imbuto separatore, si fa eluire la colonna con 100 mL di diclorometano. Il solvente si fa evaporare all'evaporatore rotante, si riprende il residuo con 2×2 mL di diclorometano, e si agita su vortex e in bagno ad ultrasuoni fino a scioglimento. Si trasferisce la soluzione in provette di vetro, si essicca sotto flusso di azoto e si riprende il residuo con 500 μ L di metanolo. Si filtra e si trasferisce il campione nel vial per l'analisi HPLC. Infine, si procede alla determinazione cromatografica, attraverso lo strumento dotato di rivelatore di massa a trappola ionica.

Il metodo è idoneo a dosare concentrazioni di Clothianidin comprese tra 2,4 e 8,6 μ g /Kg.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Per quanto concerne la determinazione e quantificazione di residui di neonicotinoidi mediante tecnica analitica LC/MS, sono stati analizzati 80 campioni di api morte: per 8 di questi è stata evidenziata positività al Clothianidin.

L'immagine che segue (Figura 1) riporta la distribuzione dei campioni positivi al Clothianidin secondo la località in cui sono state sistemate le stazioni di monitoraggio.

Figura 1. Mappa delle stazioni di monitoraggio

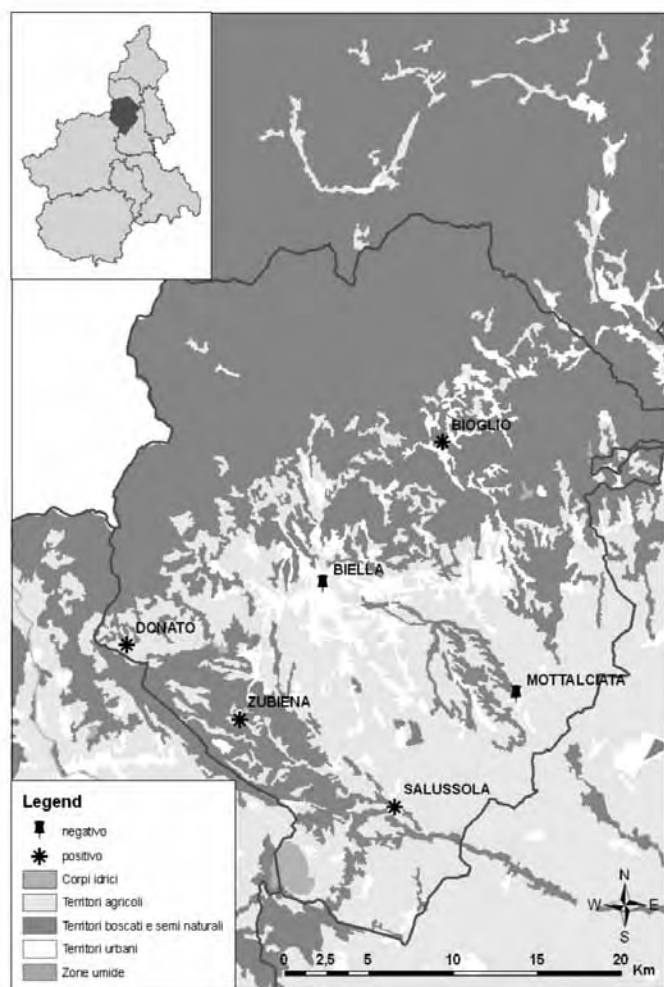


Tabella 2. Campioni analizzati e positivi al Clothianidin nel territorio

stazione di monitoraggio	N. campioni analizzati	[Clothianidin] > 2.4 μ g/Kg	%
BIELLA	12	0	0,0%
DONATO	17	1	5,9%
MOTTALCIATA	5	0	0,0%
SALUSSOLA	14	2	14,3%
BIOGLIO	13	3	23,1%
ZUBIENA	19	2	10,5%
totale complessivo	80	8	10,0%

Si può notare dalla Tabella 2 che i campioni positivi al neonicotinoide in esame risultano essere in località Donato (N=1), in località Zubiena (N=2), in località Salussola (N=2) e infine in località Bioglio (N=3); le prime tre località si trovano nella zona sud occidentale della provincia di Biella con colture a maggioranza viticola.

Il Decreto Ministeriale 17/09/2008 stabilisce la sospensione cautelativa dell'autorizzazione all'impiego per la concia di sementi dei prodotti fitosanitari contenenti le sostanze attive Clothianidin, Thiamethoxam, Imidacloprid e Fipronil fino alla data del 31/10/2011. Tale decreto ha riguardato le colture maidicole ma non le colture viticole; è quindi possibile supporre che la presenza di positivi nella zona a sud ovest di Biella sia dovuta alla forte vocazione vinicola della zona, nella quale viene coltivato il vitigno erbaluce.

Le positività riscontrate a Bioglio, che non si trova in un'area a tradizione viticola, possono chiamare in causa un uso improprio di neonicotinoidi. A maggior ragione, tali risultati suggeriscono di riservare grande attenzione al problema.

BIBLIOGRAFIA

1. Progetto APENET "Effetti del mais conciato sulle api (2009).
2. T. Iwasa, N. Motoyama, J. T. Ambrose, R. M. Roe. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honeybee, *Apis Mellifera*. Crop Protection 23 (2004) 371-378.
3. EU Pesticides database.
4. Desneux N, Decourtye A, Delpuech J. *The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods*. Annual Review of Entomology 2007; 52: 81-106.
5. Celli G., Porrini C. (1991). L'ape, un efficace bioindicatore dei pesticidi. Le Scienze 274 : 42 – 54.

STUDIO MORFOLOGICO DI CELLULE STROMALI MESENCHIMALI MULTIPOTENTI (CSM) DA TESSUTO ADIPOSO DI CAVALLO COLTIVATE CON DUE DIVERSI TERRENI

Pascucci L.¹, Mercati F.¹, Ceccarelli P.¹, Dall'Aglio C.¹, Marini C.²

¹ Dip. di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Produzioni Animali ed Alimentari, Università di Perugia

² U.O. Immunologia – Ist. Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

KEY WORDS: cellule stromali mesenchimali multipotenti, cavallo, terreno di coltura.

ABSTRACT

Multipotent mesenchymal stromal cells, also known as mesenchymal stem cells (MSCs), are a population of adult stem cells with a huge potential in cell-based regenerative therapies. The rapid increase of their use in experimental clinical procedures, have highlighted the necessity of coordination among the different research groups. The development of a common operative protocol of isolation and culture, in fact, could greatly optimize the success of cell clinical employment and the comparison of results. The aim of the present study was to evaluate the morphological features of MSCs isolated from equine adipose tissue and cultivated with two different media: Earle Minimum Essential Medium (Earle-MEM) and Dulbecco's modified Eagle Medium (D-MEM). Cell morphology was evaluated at light and at transmission electron microscopy. Our data suggest that different media may yield significant differences in the morphology of cultured MSCs. As a consequence, the choice of culture media has to be carefully evaluated since a variable efficacy *in vivo*, due to different culture conditions, cannot be excluded.

INTRODUZIONE

Numerose condizioni patologiche, siano esse di natura degenerativa o traumatica, sono accompagnate dall'estesa perdita di cellule specializzate all'interno di organi e tessuti, a cui consegue un grave deficit funzionale. La cura di tali patologie comporta spesso lunghi trattamenti ed alti costi di assistenza medica e dà luogo a risultati non sempre soddisfacenti che determinano un abbassamento della qualità di vita. La messa in atto di nuovi trattamenti in grado di ripristinare la struttura e la funzione dei tessuti e degli organi lesionati assume pertanto grande rilevanza scientifica e pratica. Negli ultimi anni, la crescente attenzione nei confronti delle cellule staminali e l'interesse scaturito dal loro possibile impiego in medicina rigenerativa, ha portato ad una sempre più estesa ed approfondita ricerca riguardante i processi biologici che le caratterizzano. Importante oggetto di studio, a tal proposito, sono risultate le cellule staminali adulte ed, in particolare, le cellule stromali mesenchimali multipotenti (CSM), meglio note come cellule staminali mesenchimali. Si tratta di cellule adulte capaci di autorinnovarsi e caratterizzate da un considerevole potenziale proliferativo e differenziativo. Numerose evidenze sperimentali e cliniche fanno ritenere che il trapianto di CSM possa rappresentare una concreta alternativa alle cure attualmente disponibili per le numerose patologie caratterizzate da perdita di sostanza, essendo in grado di indurre un processo rigenerativo del tessuto lesso ed un ripristino della sua funzionalità.

Grande attenzione è stata rivolta più di recente allo studio di CSM negli animali domestici: la specie equina risulta particolarmente interessante in considerazione dell'ormai largo impiego di CSM nel trattamento di lesioni tendinee, legamentose ed articolari (1, 2). Il tessuto adiposo risulta tra le fonti di CSM più utilizzate: cellule isolate da tessuto adiposo

possono essere coltivate *in vitro* per tempi piuttosto lunghi dando origine ad un monostrato di elementi fibroblastoidi aderenti e multipotenti (3).

Già da qualche anno, CSM da tessuto adiposo di cavallo (AdCSM) vengono isolate, amplificate, caratterizzate e crioconservate presso i nostri laboratori. L'esperienza maturata ci ha consentito di allestire una banca di cellule che vengono utilizzate nel trattamento di lesioni tendinee e legamentose di cavalli sportivi (4). Il crescente impiego di AdCSM in applicazioni cliniche sperimentali da parte di molti gruppi di ricerca ci ha portato, tuttavia, al convincimento che la definizione di un protocollo operativo comune sia oramai una necessità ineludibile. La standardizzazione delle procedure consentirebbe infatti di ottimizzare le tecniche di preparazione ed impiego delle cellule e di ottenere risultati ripetibili e dati confrontabili tra i diversi laboratori, avviando così una fase di valutazione più consapevole dell'efficacia della terapia cellulare stessa (5). Con questo obiettivo, il nostro gruppo di lavoro si è occupato dello studio di alcuni particolari aspetti della biologia delle AdCSM e di come, procedure e condizioni sperimentali diverse, possano interferire con le caratteristiche cellulari e con la loro eventuale efficacia clinica. In questo studio, in particolare, è stato valutato l'impatto che due terreni di coltura diversi, manifestano nei confronti del modello di crescita e della morfologia cellulare. A questo scopo, AdCSM coltivate in doppio con Earle Minimal Essential Medium (Earle-MEM) e con Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) sono state valutate al microscopio ottico ed elettronico a trasmissione (TEM) per evidenziarne le differenze morfologiche.

MATERIALI E METODI

Due campioni di tessuto adiposo sottocutaneo sono stati prelevati da cavalli sottoposti ad intervento chirurgico in anestesia generale per patologie addominali. Dopo 3 lavaggi in tampone fosfato salino (PBS) addizionato di antibiotici ed antimicotici, i campioni di tessuto sono stati finemente sminuzzati, digeriti con collagenasi I (Worthington Biochemical - Lakewood, NJ) allo 0,075% in PBS per 30 minuti a 37 °C e quindi centrifugati. Il pellet così ottenuto, costituito dalla componente vascolo-stromale del tessuto, è stato trattato con ammonio cloruro allo 0,83% per lisare i globuli rossi residui. Le cellule sono state infine contate e seminate in doppio in terreno DMEM (Gibco - Gaithersburg, Md) ed in terreno Earle-MEM (Gibco - Gaithersburg, Md), entrambi addizionati di siero fetale bovino al 10% (Gibco (Gaithersburg, Md), 100 U/ml penicillina, 100 µg/ml streptomycin, 12.5 µg/ml anfotericina B (Sigma-Aldrich - St. Louis, Mo) (passaggio 0). Al raggiungimento dell'80% di confluenza, le cellule sono state staccate con tripsina allo 0.05% in EDTA e riseminate ad una densità di 5-10.000 cells/cm² (passaggio 1). Questa operazione è stata eseguita per 10 passaggi consecutivi nel corso dei quali le cellule sono state osservate quotidianamente al microscopio ottico rovesciato (Olympus

CK2) ed occasionalmente fissate e colorate per studiarne le caratteristiche in modo più accurato. Un'aliquota di cellule al passaggio 3 è stata inoltre lasciata in coltura per 3 settimane senza essere mai passata, ma subendo un regolare cambio del terreno: questa prova è stata eseguita per verificare eventuali episodi di differenziazione spontanea. Al termine delle 3 settimane, le cellule sono state colorate con Oil Red 0 per evidenziare un'eventuale differenziazione adipogenica, e con Rosso di Alizarina, per evidenziare un'eventuale differenziazione osteogenica. Cellule al passaggio 3 (21-24 giorni in coltura), infine, sono state fissate in glutaraldeide al 2.5% per 2 ore a temperatura ambiente, staccate dal pozzetto mediante *cell scraper* e centrifugate a 600g per 10 minuti allo scopo di rimuovere il fissativo. Il pellet è stato quindi lavato in PBS, post fissato in tetrossido di osmio al 2%, disidratato in etanolo, preinfiltrato ed incluso in resina epossidica (Epon 812). Sezioni ultrasottili (90 nm) sono state montate su griglie di rame da 200 mesh, contrastate con acetato di uranile e citrato di piombo ed esaminate con un microscopio elettronico a trasmissione di tipo Philips EM 208 munito di telecamera digitale.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Al microscopio ottico, le cellule coltivate in DMEM presentano un'iniziale fase di adattamento al nuovo habitat, per poi dare vita ad una rapidissima crescita che le porta a raggiungere la sub-confluenza in pochi giorni. Il monostrato così formato è costituito da cellule tipicamente fibroblastoidi che, con l'aumentare della densità, tendono ad organizzarsi in fasci ad andamento vorticoso. Al contrario, le cellule coltivate in MEM mostrano da subito una crescita meno esuberante e tendono a dare origine ad un monostrato meno compatto sul quale sono disseminate aree a maggior densità cellulare di colore giallo-brunastro. Tale modalità di crescita ricorda quella descritta in letteratura per le CSM della specie umana. Con il passare del tempo (passaggi superiori al 6°), le cellule coltivate in DMEM mostrano una certa tendenza a dare origine ad elementi di dimensioni maggiori rispetto alla popolazione basale, fino addirittura alla comparsa di rare cellule "giganti" contenenti vacuoli ed inclusioni citoplasmatiche. Una fine vacuolizzazione si apprezza anche a livello delle altre cellule. Nella linea cellulare coltivata in MEM, le singole cellule sembrano caratterizzate da un profilo meno netto e da un citoplasma più evanescente. La popolazione nel suo insieme tende a mantenere delle caratteristiche morfologiche costanti e non si osservano elementi di dimensioni abnormi. Il campione mantenuto in coltura per 3 settimane senza subire passaggi, ha permesso di osservare una interessante diversità tra le due linee cellulari. Le cellule in DMEM, benché spinte a stratificarsi più volte dalla prolungata coltivazione, non subiscono alcun processo di differenziazione spontanea morfologicamente apprezzabile. Al contrario, nelle cellule coltivate in MEM, si osserva una chiara positività tanto nei confronti dell'Oil Red che nei confronti dell'Alizarina, a testimoniare un principio di differenziazione spontanea. Particolare rilievo meritano i dati emersi dall'osservazione ultrastrutturale che ha consentito di evidenziare, in entrambe le linee cellulari, una morfologia tipica di elementi immaturi con intensa attività proliferativa e metabolica. Le cellule presentano un citoplasma particolarmente ricco di organuli, con abbondante reticolo endoplasmatico rugoso di aspetto lacunare, numerosissimi ribosomi liberi, apparato di Golgi ben sviluppato, nucleo eucromatico con due o più nucleoli (6). Le cellule coltivate in DMEM, tuttavia, mostrano un maggiore

sviluppo degli elementi dell'apparato endosomiale: vescicole di pinocitosi, endosomi precoci e tardivi, autofagosomi, lisosomi e corpi residui popolano il citoplasma in modo ubiquitario. Questo aspetto morfologico testimonia, da una parte, l'elevato ricambio degli organuli subcellulari, dall'altra, l'esistenza di un intenso traffico di molecole dall'ambiente esterno a sostegno dell'attività metabolica e proliferativa cellulare.

I dati emersi dalle indagini citomorfologiche descritte permettono di elaborare le seguenti considerazioni conclusive. Il terreno DMEM determina sulle cellule una spinta proliferativa maggiore del MEM, quanto meno nelle fasi iniziali della coltivazione. Questo produce due tipi di conseguenze: da una parte consente di ottenere in poco tempo un'efficace amplificazione numerica delle cellule, fatto non trascurabile in vista di un loro tempestivo impiego clinico. Al contempo, non va però trascurato l'impatto che tale velocità di crescita determina sulla morfologia cellulare: è probabile che l'intensa attività proliferativa e metabolica determinino un vero e proprio "ingolfamento cellulare" (vacuoli al microscopio ottico e formazioni endosomiali al TEM) che potrebbe teoricamente influire sul buon funzionamento delle cellule anche dopo il trapianto. Di contro, non va minimizzata la tendenza che mostrano le cellule coltivate in MEM di indirizzarsi verso una pseudo-differenziazione spontanea che ne limiterebbe, ovviamente, il potenziale proliferativo e differenziativo in corso di uso terapeutico.

E' possibile concludere, pertanto, che la scelta del medium va attentamente ponderata nel momento in cui si allestisce una coltura di cellule destinate all'uso terapeutico: non è escluso, infatti, che una variabilità dell'efficacia *in vivo* possa essere determinata dalle condizioni di coltura a cui le cellule sono state sottoposte.

BIBLIOGRAFIA

1. Richardson LE, Dudhia J, Clegg PD, Smith R. (2007) Stem cells in veterinary medicine-attempts at regenerating equine tendon after injury. *Trends Biotechnol*; 25(9):409-16.
2. Godwin EE, Young NJ, Dudhia J, Beamish IC, Smith R. (2011) Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon *Equine Vet J* (In press).
3. Vidal MA, Kilroy GE, Lopez MJ, Johnson JR, Moore RM, Gimble JM. (2007) Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Vet Surg*; 36(7):613-22.
4. Pascucci L, Mercati F, Marini C, Dall'aglio C, Marenzoni ML, Ceccarelli P. (2011) Allestimento di una banca di cellule staminali mesenchimali (CSM) da tessuto adiposo di cavallo da impiegare in trapianti allogenici: effetti della crioconservazione sulla morfologia cellulare, sulla crescita in coltura e sull'efficacia clinica. *Banking horse adipose-derived mesenchymal stem cells for allogenic transplantation: how cryoconservation affects cell morphology, cultural features and in vivo efficacy*. *Ippologia*; 22(1):15-22.
5. Ho AD, Wagner W, Franke W. (2008) Heterogeneity of mesenchymal stromal cell preparations. *Cytotherapy*; 10(4): 320-330. Review.
6. Pascucci L, Mercati F, Marini C, Ceccarelli P, Dall'Aglio C, Pedini V, Gargiulo AM. (2010) Ultrastructural morphology of equine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Histol Histopathol*; 25(10): 1277-1285.

ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* ISOLATI DA MOLLUSCHI EDULI LAMELLIBRANCHI

Pasquale V.¹, Romano V.¹, Capuano F.², Bove D.², Rupnik M.³, Aliberti F.⁴, Guarino A.², Porcaro F.¹, Cirillo M.¹, Dumontet S.¹

¹ Dipartimento di Scienze dell'Ambiente, Università degli Studi di Napoli Parthenope, Napoli, Italia;

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale per il Mezzogiorno, Portici, Napoli, Italia;

³ Faculty of Medicine, University of Maribor and Institute of Public Health Maribor, Maribor, Slovenia;

⁴ Dipartimento delle Scienze Biologiche, Sezione Fisiologia e Igiene, Università degli Studi di Napoli "Federico II"

Keywords: *Clostridium difficile*, *Mytilus galloprovincialis*, *Donax trunculus*

ABSTRACT

Clostridium difficile is a spore-forming Gram-positive bacterium responsible for severe intestinal infections both in humans and animals. In this study 46 samples of marine edible bivalve molluscs were analyzed to evaluate the occurrence of *C. difficile*. Fifty four percent of samples were contaminated by *C. difficile*. Eleven out of 25 isolates belonged to 7 different known ribotypes and 14 did not match any of reference riboprofiles kept in our library. The majority of the isolates (68%) was toxigenic. Our results identify edible bivalve molluscs as a reservoir of toxigenic *C. difficile* strains.

INTRODUZIONE

Clostridium difficile è un bacillo sporigeno Gram positivo, isolato per la prima volta nel 1935 da Hall e O'Toole, responsabile di infezioni intestinali di diversa gravità sia nell'uomo che negli animali (Dubberke et al. 2011; Freeman et al. 2010). La patogenicità del batterio è legata soprattutto alla produzione di due potenti tossine: la tossina A (enterotossina) e la tossina B (citotossina), espresse, rispettivamente, dai geni *tcdA* e *tcdB*. Storicamente le infezioni da *C. difficile* sono state correlate alla degenza in ambienti nosocomiali e/o all'uso di antibiotici a largo spettro che, alterando il microbiota intestinale, predispongono all'evoluzione dell'infezione verso forme gravi (colite pseudomembranosa, megacolon tossico e perforazione intestinale). Nell'ultimo decennio, nel Nord America ed in Europa, sono state descritte gravi epidemie sostenute da un ceppo ipervirulento di *C. difficile* (BI/NAP1/027), che sintetizza una tossina binaria (CDT), oltre a produrre le tossine A e B. Il ruolo della CDT nella patogenicità del batterio non è stato ancora ben definito. Recentemente è stato rilevato un aumento delle infezioni da *C. difficile* acquisite in comunità o in pazienti che non erano considerati a rischio (Freeman et al., 2010). Il frequente isolamento del batterio anche da diversi prodotti alimentari quali carne (Rodriguez-Palacios et al. 2007), vegetali (Metcalf et al., 2010), frutti di mare e pesce (Metcalf et al., 2011) ha riaperto la discussione sulle modalità con cui l'uomo viene in contatto con il batterio. Scopo del presente studio è stato quello di valutare la prevalenza di *C. difficile* in molluschi eduli lamellibranchi di diversa origine, prelevati nell'ambito del Golfo di Napoli.

MATERIALI E METODI

Durante il periodo gennaio-aprile 2011, 46 campioni di molluschi eduli lamellibranchi sono stati prelevati dagli organi ispettivi preposti ai controlli ufficiali. Due campioni di *Tapes philippinarum* ed 1 di *Donax trunculus*, sono stati prelevati da 3 peschierie di Portici (NA), mentre 43 campioni di *Mytilus galloprovincialis* sono stati raccolti presso 8 impianti di molluschicoltura localizzati in diverse aree del Golfo di Napoli (Tab. 1). Per l'arricchimento di *C. difficile*, 10 grammi

di tessuto e liquido intervalvare, dopo omogeneizzazione mediante stomacher in 90 ml di BHI (Oxoid), reso selettivo dall'aggiunta di sodio taurocolato (Sigma-Aldrich) e CDMN supplement (Oxoid), sono stati incubati in anaerobiosi per 10 giorni. Successivamente è stato effettuato l'alcool-shock, aggiungendo a 2 ml della brodocoltura di arricchimento 2 ml di etanolo (95%) e lasciando agire 50' a temperatura ambiente; la miscela è stata poi centrifugata ed il pellet strisciato su piastre di CDMN agar (Oxoid). Dopo incubazione in anaerobiosi per 48 h, le colonie rizoidi, costituite da bacilli Gram positivi e positive al test della prolina-aminopeptidasi (Oxoid), sono state agglutinate mediante il test al lattice per *C. difficile* (Oxoid). Tutti gli isolati latex positivi sono stati sottoposti ad identificazione molecolare, presso l'Institute of Public Health Maribor (IPHM), Centre for Microbiology, Maribor (Slovenia), mediante amplificazione del gene specie-specifico *cdd3*. Sui ceppi identificati come *C. difficile*, infine, è stata effettuata la tipizzazione molecolare per la definizione del ribotipo e del tossinotipo (Zidaric et al., 2010). I PCR ribotipi sono stati designati o secondo la nomenclatura standard di Cardiff, se il profilo corrispondeva ad uno dei ribotipi di riferimento disponibili (001, ...), o con nomenclatura interna dell'IPHM (SLO 001, ...).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nel corso dello studio, 25 (54%) dei 46 campioni di molluschi bivalvi esaminati sono risultati contaminati da *C. difficile*: 24 di *M. galloprovincialis* ed 1 di *D. trunculus*. Tra i 25 ceppi isolati 11 sono risultati appartenere a 7 diversi ribotipi noti: 014/020 (3), 078, 126 (2), 001, 023, 029 e 046 (1); 14 ceppi che non presentavano riboprofilo simili ai ribotipi di riferimento disponibili presso l'IPHM, invece, sono stati associati ad 11 ribotipi diversi (Tab. 1). Il 68% degli isolati è risultato possedere i geni *tcdA* e *tcdB*: tutti gli isolati appartenenti ai ribotipi noti e 6 (42,8%) dei 14 isolati con riboprofilo diversi dai ceppi di riferimento. I geni della tossina binaria, inoltre, sono stati amplificati nel 29,4% degli isolati *tcdA* e *tcdB* positivi: 2 di ribotipo 078 (tossinotipo V), 2 di ribotipo 126 (tossinotipo V) ed 1 di ribotipo 023 (tossinotipo IV); questi batteri, pertanto sono caratterizzati da un profilo tossigenico A+B*CDT⁺ (Tab. 1). Nell'ambito degli isolati con riboprofilo diverso dai ceppi di riferimento, 10 sono stati associati ad 8 ribotipi già presenti nella ceppoteca dell'IPHM, mentre 4 sono risultati appartenere a 3 nuovi ribotipi non tossigenici (SLO 131, SLO 135, SLO 136); inoltre, i 5 isolati tossigenici sono risultati appartenere tutti al tossinotipo 0. L'elevata percentuale di contaminazione dei molluschi analizzati, tipici organismi sospensivori, potrebbe essere correlata alla loro capacità di concentrare la componente particolata ed i batteri e virus, a questa associati in sospensione nell'acqua; tale ipotesi è supportata anche dall'isolamento di *C. difficile* da alcune matrici (acqua, zooplancton e molluschi bivalvi) campionate nel Golfo di Napoli (Pasquale et al. 2010). La presenza di ceppi

tossigenici di *C. difficile*, in alcuni casi ipervirulenti, in molluschi filtratori pone seri problemi di sanità pubblica, soprattutto se si considera che questi prodotti vengono spesso consumati crudi o poco cotti. La forma sporigena permette, inoltre, la sopravvivenza del batterio anche quando l'alimento viene sottoposto a cottura intorno ai 70°C (Rodriguez-Palacios et al., 2010; Rupnik e Songer, 2010). Ulteriori studi sono necessari per valutare l'efficienza dei sistemi di depurazione nella decontaminazione dei bivalvi contaminati da batteri patogeni sporigeni e per valutare l'incidenza di ceppi tossigenici di *C. difficile* nei prodotti pronti alla vendita.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Hall I.C., O'Toole E. (1935) Intestinal flora in new-born infants. *Am J Dis Child* 49:390-402.
- 2) Dubberke E.R., Haslam D.B., Lanzas C., Bobo L.D., Burnham C.A., Gröhn Y.T., Tarr P.I. (2011) The ecology and pathobiology of *Clostridium difficile* infections: an interdisciplinary challenge. *Zoonoses Public Health* 58:4-20.
- 3) Freeman J., Bauer M.P., Baines S.D., Corver J., Fawley W.N., Goorhuis B., Kuijper E.J., Wilcox M.H. (2010) The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. *Clin Microbiol Rev* 23:529-549.
- 4) Metcalf D.S., Costa M.C., Dew W.M.V., Weese J.S. (2010) *Clostridium difficile* in vegetables, Canada. *Lett Appl Microbiol* 51:600-602.
- 5) Metcalf D., Avery B.P., Janecko N., Matic N., Reid-Smith R., Weese J.S. (2011) *Clostridium difficile* in seafood and fish. *Anaerobe* 17:85-86.
- 6) Pasquale V., Romano V., Krovacek K., Ciznar I., Aliberti F., Dumontet S. (2010) Isolation of *Clostridium difficile* from marine coastal environment (Gulf of Naples, Southern Italy). *Clin Microbiol Infect* 16 (Suppl. 2):S676.
- 7) Rodriguez-Palacios A., Staempfli H.R., Duffield T., Weese J.S. (2007) *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. *Emerg Infect Dis* 13:485-487.
- 8) Rodriguez-Palacios A., Reid-Smith R.J., Staempfli H.R., Weese J.S. (2010) *Clostridium difficile* survives minimal temperature recommended for cooking ground meats. *Anaerobe* 16:540-542.
- 9) Rupnik M., Songer J.C. (2010) *Clostridium difficile*: its potential as a source of foodborne disease. In Steve L. Taylor editor: *Advances in Food and Nutrition Research*, Vol. 60, Burlington: Academic Press, pp.53-66.
- 10) Zidaric V., Beigot S., Lapajne S., Rupnik M. (2010) The occurrence and high diversity of *Clostridium difficile* genotypes in rivers. *Anaerobe* 16:371-375.

Tab. 1 – Ceppi di *Clostridium difficile* isolati da campioni di molluschi bivalvi di diversa origine. La sigla SLO seguita da un numero indica riboprofilo diversi dai quelli di riferimento

Provenienza campioni (numero)	<i>Clostridium difficile</i>		
	Ribotipo	Tossinotipo	Profilo Tossigenico
Portici [†] (3)	SLO 135 [§]	Tox-	A-B-CDT ⁻
	014/020	0	A*B+CDT ⁻
Lucrino [‡] (6)	SLO 006	0	A*B+CDT ⁻
	SLO 131 [§] 001	Tox- 0	A-B-CDT ⁻ A*B+CDT ⁻
Lucrino [‡] (5)	SLO 026 (2)	0	A*B+CDT ⁻
	SLO 131 [§]	Tox-	A-B-CDT ⁻
L. Fusaro [‡] (5)	SLO 002	Tox-	A-B-CDT ⁻
	SLO 036	0	A*B+CDT ⁻
	014/020	0	A*B+CDT ⁻
	078	V	A*B+CDT ⁺
Bacoli [‡] (5)	SLO 136 [§] 029	Tox- 0	A-B-CDT ⁻ A*B+CDT ⁻
	046	0	A*B+CDT ⁻
	078	V	A*B+CDT ⁺
	126 (2)	V	A*B+CDT ⁺
Torre del Greco [‡] (12)	SLO 078	Tox-	A-B-CDT ⁻
	SLO 016	0	A*B+CDT ⁻
	SLO 095	Tox-	A-B-CDT ⁻
	014/020	0	A*B+CDT ⁻
Torre del Greco [‡] (4)	023	IV	A*B+CDT ⁺
	SLO 064	Tox-	A-B-CDT ⁻
C.mare di Stabia [‡] (4)	SLO 009	0	A*B+CDT ⁻
P. Cavallo Nisida [‡] (2)	//	//	//

[†] Pescherie; [‡] Allevamento; [§] Nuovo ribotipo di *C. difficile*.

FORUNCOLOSI IN UN ESEMPLARE DI CARIBE PIRANHA (*PYGOCENTRUS CARIBA*) STABULATO IN ACQUARIO DOMESTICO: PROVE DI TRATTAMENTO ORALE CONTROLLATO

Pavoletti E., Viola E.*, Arsieni P., Rosso A.*, Saragaglia C., Mogliotti P.*, Prearo M.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino;

* Sezione Territoriale di Asti, Viale Pilone, 113 – 14100 Asti.

Key words: Caribe piranha, Foruncolosi, Trattamento orale controllato

INTRODUZIONE

I piranha sono un gruppo di pesci, riuniti in 12 generi diversi, appartenenti alla famiglia Characidae, sottofamiglia Serrasalminae (4). I piranha sono dei pesci gregari che vivono generalmente in grossi branchi: le abitudini predatorie, spesso descritte dall'immaginario collettivo in modo esagerato, sono rivolte generalmente ad altri pesci o a piccoli animali acquatici, anche se occasionalmente è possibile osservare aggressioni a grossi animali con risultati devastanti; infatti, la pericolosità di questi pesci sta nel loro numero all'interno del branco (2). Nell'habitat naturale i piranha svolgono l'importante funzione di eliminare le carcasse degli animali morti, evitandone la putrefazione e mantenendo le acque pulite. Vivono in Sudamerica, prevalentemente nelle acque torbide del grande bacino amazzonico e dell'Orinoco (1; 2; 4).

Morfologicamente, la caratteristica maggiormente distintiva della specie è senza dubbio la bocca, con mandibola molto pronunciata ed armata da una fila di grandi denti triangolari, i cui margini coincidono con quelli posti sulla mascella, più piccoli; tale struttura, insieme ad una potente muscolatura mascellare rende la bocca dei piranha uno strumento efficace nel tranciare di netto la carne dalla preda (2). Nonostante la loro potenziale pericolosità, numerose specie sono considerate ospiti ricercati per l'acquariofilia.

Il caribe piranha o black spot piranha o red bellied piranha (*Pygocentrus cariba*) è tra le specie più ricercate anche nel nostro paese, dove generalmente gli esemplari vengono mantenuti in ampi acquari singolarmente o in coppia, data la loro notevole aggressività e le dimensioni considerevoli che possono raggiungere. E' originario della porzione venezuelana del bacino dell'Orinoco ed in cattività può vivere anche oltre 15 anni (1; 2).

Nonostante questa relativa diffusione, le segnalazioni di patologie in questa specie sono molto scarse.

Scopo del presente lavoro è quello di contribuire alle conoscenze sulle possibili malattie che possono colpire questa specie e di evidenziare l'efficacia della terapia intrapresa.

MATERIALI E METODI

Il caribe piranha oggetto di questo studio è un esemplare di 5 anni di età, di circa 1.500 grammi di peso, mantenuto in una vasca di 300 litri, con filtro biologico esterno e in condizioni controllate; da sempre l'alimentazione è esclusivamente costituita da pezzi di filetti freschi di salmone o trota iridea d'allevamento, somministrati giornalmente in vasca.

Nel mese di febbraio 2011, il soggetto ha cominciato a manifestare un comportamento anomalo che è stato prontamente annotato e ripreso dal proprietario.

Contattato il laboratorio è stata inviata la documentazione fotografica prodotta: si è deciso di procedere all'osservazione dell'andamento del caso, in quanto vista l'anamnesi, non si ravvisavano segni particolari da poter definire una causa precisa per tale comportamento.

Nei giorni successivi il quadro sintomatologico è peggiorato tanto da far ritenere opportuno intraprendere una terapia per via orale, con somministrazione di ossitetraciclina (75 mg/kg p.v.), inserita all'interno della carne di pesce utilizzata come alimento, per 7 giorni. Durante il periodo di somministrazione del farmaco è stato annotato e documentato fotograficamente l'andamento del caso.

RISULTATI

Il comportamento anomalo iniziale, segnalato dal proprietario, era rappresentato da irrequietezza del soggetto, con movimenti a scatto improvvisi e continui sfregamenti energici contro gli arredi, seguiti successivamente da violenti impatti contro il vetro dell'acquario.

Alcuni giorni dopo l'insorgere di questi comportamenti anomali, il proprietario ha notato la comparsa di piccole aree rossastre sul fianco e sul dorso, che nel corso dei giorni successivi sono andate aumentando di dimensione. Nei giorni seguenti, in corrispondenza delle aree rossastre sono comparse delle vere e proprie tumefazioni color rosso mattone, rilevate, del tutto simili a quelle che si riscontrano in casi sub-cronici di foruncolosi dei Salmonidi (Figura 1).

Figura 1 – Soggetto con evidente tumefazione al fianco, nella parte posteriore ventrale (cerchio nero).



Vista l'evoluzione delle lesioni e l'andamento della patologia, viste le difficoltà oggettive di procedere con un isolamento batterico, si è effettuata una diagnosi presuntiva di foruncolosi. Si è pertanto optato per una terapia d'urgenza per via orale, utilizzando come antibiotico l'ossitetraciclina inserita all'interno della carne di pesce utilizzata come alimento: la scelta di tale terapia è stata effettuata verificando gli antibiogrammi ottenuti dagli isolamenti di foruncolosi degli ultimi anni in trote d'allevamento.

La terapia si è protratta per 7 giorni con totale regressione della sintomatologia e delle lesioni (Figura 2).

Figura 2 – Regressione della tumefazione al fianco dopo trattamento antibiotico (cerchio bianco).



DISCUSSIONE

La diagnosi è stata condotta in base alle manifestazioni sintomatologiche descritte dal proprietario e alle lesioni facilmente visionabili nelle fotografie prodotte; tale valutazione è stata avvalorata anche dalle abitudini alimentari e dalle condizioni di isolamento del soggetto, portando ad escludere tutte le cause possibile, esclusa quella dovuta ad alimento contaminato.

La foruncolosi, sostenuta da *Aeromonas salmonicida*, è una batteriosi abbastanza frequente nei salmonidi di allevamento, soprattutto nella sua forma cronica (3; 6). L'abitudine esclusiva di alimentare il piranha con filetti freschi di salmone o di trota iridea, facilmente ha determinato l'instaurarsi della patologia con la somministrazione di carne contaminata dal germe agente della foruncolosi.

La terapia è stata intrapresa sia sulla base dell'anamnesi e della visione del quadro sintomatologico e delle lesioni cutanee, sia cercando di somministrare l'antibiotico più utile in base alla letteratura (5) e ai risultati degli antibiogrammi effettuati dal laboratorio in episodi analoghi in trota iridea d'allevamento. La somministrazione del farmaco è stata obbligatoriamente quella orale, mediante incorporazione dell'antibiotico nel muscolo di trota, per semplificare le operazioni al proprietario e per avere una certezza sulla somministrazione della dose stabilita.

La diagnosi e la successiva terapia con la scelta della molecola antibiotica e la via di somministrazione, sono risultate corrette, con remissione completa della sintomatologia e delle lesioni cutanee, visibilmente già dopo 4 giorni. Il soggetto, dopo la conclusione del trattamento, non ha più presentato anomalie comportamentali.

Non potendo parlare di segnalazione vera e propria di foruncolosi in questa specie, in quanto non si è effettuato un isolamento batterico, la descrizione di questo caso è importante in quanto mette in risalto l'importanza della tempestività diagnostica in ambiente confinato, ma soprattutto in casi di pesci ornamentali di alto pregio; risulta inoltre importante la scelta di alimenti che siano controllati per evitare possibili introduzioni di patogeni anche per via alimentare.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Gaviria J.I., Nirchio M., Granado A. & Estrada A. (2005). Karyotype and nucleolar organizer region of *Pygocentrus cariba* (Serrasalminae) from Caicara del Orinoco, Venezuela. *INCI*, 30, 1: 44-47.
- (2) González S.A.R. & González E.M. (2001). Variación estacionales ontogenética en la alimentación de *Pygocentrus cariba* (Humboldt, 1829) en una laguna de inundación de la cuenca del Orinoco medio. *Saber, Univ. de Oriente, Venezuela*, 13, 1: 3-7.
- (3) Gustafson C.E., Thomas C.J. & Trust T.J. (1992). Detection of *Aeromonas salmonicida* from fish by using Polymerase Chain Reaction amplification of the virulence surface array protein gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 12: 3816-3825.
- (4) Hubert N., Duponchelle F., Nuñez J., Garcia-Davila C., Paugy D. & Renno J.-F. (2007). Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. *Mol. Ecol.*, 16: 2115-2136.
- (5) Inglis V. & Richards R.H. (1991). The in vitro susceptibility of *Aeromonas salmonicida* and other fish-pathogenic bacteria to 29 antimicrobial agents. *J. Fish Dis.*, 14, 6: 641-650.
- (6) Wiklund T. & Dalsgaard I. (1998). Occurrence and significance of atypical *Aeromonas salmonicida* in non-salmonid and salmonid fish species: a review. *Dis. Aquat. Org.*, 32: 49-69.

SUMMARY

This paper described a suspected case of furunculosis in caribe piranha (*Pygocentrus cariba*), probably caused by the introduction of the pathogen (*Aeromonas salmonicida*) across the feed. The fish initially had an abnormal behavior in the aquarium, with restlessness, abnormal and irregular movements, vigorous rubbing against the equipment. Successively the fish are shown reddish swellings on the skin. The therapy with orally administration of oxytetracycline, has been successful, with remission of symptoms after 7 days.

MONITORAGGIO DI MOLLUSCHI EDULI LAMELLIBRANCHI PER LA RICERCA DEL VIRUS DELL'EPATITE E (HEV)

Pavoni E., Consoli M., Bertasi B., Saetti F., Ferrari M., Peroni S., Losio M. N.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Reparto Tecnologia Acidi Nucleici applicata agli Alimenti

Key words: Virus dell'epatite E (HEV); PCR

SUMMARY

Hepatitis E virus (HEV) is the major cause of several outbreaks of water-borne hepatitis in tropical countries and of sporadic cases of viral hepatitis in industrialized countries. In this Italian study it was researched the virus in mussels and evaluated its genetic characteristic for understanding the behaviour of the virus in these foods.

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni lo studio e l'individuazione di patogeni di natura virale negli alimenti ha assunto importanza crescente. Infatti, il loro ruolo come agenti responsabili di gastroenteriti nell'uomo rappresenta un problema di salute pubblica e diventa quindi sempre più necessaria la loro ricerca per garantire una reale sicurezza alimentare. Il virus dell'epatite E (HEV) non riveste un ruolo di prim'ordine tra i virus enterici patogeni per l'uomo, ma la sua facilità di diffusione e la clinica piuttosto severa ne inducono la ricerca nell'acqua e negli alimenti, come nelle carni suine, carni di cinghiale ed i molluschi eduli lamellibranchi.

Il virus dell'HEV è un virus, appartenente al genere degli Hepevirus, piccolo di forma sferica di 27-34 nm di diametro, caratterizzato da un RNA virale a singolo filamento di circa 7.2Kb. L'HEV è stato classificato e distinto in 4 genotipi: il genotipo 1 è tipico di casi epidemici di Asia e Africa, il genotipo 2 è stato trovato soprattutto in Messico e Africa, il genotipo 3 ha distribuzione mondiale, più tipico di USA e Europa, ed il genotipo 4 è maggiormente presente in Asia (2).

L'infezione da HEV può avvenire tramite diverse modalità di trasmissione: oro-fecale, attraverso gli alimenti, con le trasfusioni di sangue infetto e per via materno-fetale. La via oro-fecale è la modalità più frequente, legata principalmente al consumo di acqua contaminata. Quando infettato, dopo un periodo di incubazione di 4-5 settimane, l'organismo manifesta generalmente affaticamento, vomito, febbre, ittero, dolore addominale. Sono però frequenti anche i casi asintomatici e non si osservano casi di cronicizzazione. Solitamente l'infezione si verifica nei soggetti adulti e meno in quelli pediatrici. La malattia può evolvere verso la forma fulminante con un alto tasso di letalità. L'infezione da HEV risulta essere molto pericolosa anche nelle donne in gravidanza, nelle quali aumenta il rischio di aborto, di decesso e di parti prematuri (2). L'epatite E è generalmente diffusa nei paesi in via di sviluppo, associata a scarse condizioni igienico-sanitarie. In base a ciò, è stato possibile distinguere due macro-aree geografiche: 1) regioni dove la malattia ha carattere endemico, come Cina, India, nord Africa, nord America, aree del mondo in via di sviluppo, 2) regioni dove la patologia è più sporadica, come Gran Bretagna, Italia, Spagna, Giappone, Australia. Per quanto riguarda in particolare la situazione italiana, studi di prevalenza hanno dimostrato come esista un gradiente nord-sud con tassi di prevalenza vicini all'1% nelle aree settentrionali e centrali,

che arrivano al 3% nelle aree meridionali e nelle isole (3).

La fonte primaria di contaminazione da HEV è rappresentata dall'acqua, spesso causa dei fenomeni a carattere epidemico. In secondo luogo è dimostrato che la carne di suino è uno dei veicoli alimentari principali, e i dati raccolti in diversi studi potrebbero favorire il riconoscimento del carattere zoonotico dell'HEV, perché trasmissibile dal suino all'uomo. Infatti, i ceppi virali suini e umani isolati nei paesi industrializzati sono geneticamente correlati poiché appartengono allo stesso genotipo, generalmente i genotipi 3 e 4 (1). Essendo i molluschi eduli lamellibranchi degli organismi in grado di filtrare grandi quantità di acqua, essi potrebbero venire a contatto con lo stesso HEV, accumulandolo a livello della loro ghiandola, l'epatopancreas, che trattiene il 90% delle particelle sospese nell'acqua. Se tali alimenti venissero consumati crudi o non adeguatamente cotti, il virus potrebbe venire a contatto con il tessuto epatico umano e insediarsi, scatenando l'infezione. Per questo l'HEV viene routinariamente ricercato anche in questo tipo di matrice.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di effettuare un monitoraggio triennale per la ricerca del virus dell'HEV in campioni di molluschi eduli lamellibranchi, al fine di valutarne la presenza e studiare anche le possibili correlazioni genetiche tra i ceppi riscontrati.

MATERIALI E METODI

Nel periodo dall'1 Agosto 2009 all'1 Agosto 2011 sono stati conferiti alla sede di Brescia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna 826 campioni di molluschi bivalvi provenienti, distinti in *Mitylus galloprovincialis* e/o *Mitylus edulis* (cozze), *Tapes decussatus* e/o *Tapes philippinarum* (vongole) e *Crassostrea gigas* (ostriche). Tutti i campioni considerati sono stati sottoposti ad analisi per la ricerca di HEV. Sono stati selezionati un numero minimo di individui dai quali è stato prelevato l'epatopancreas, in una quantità non inferiore ai 2g. Il tessuto è stato sminuzzato finemente e trasferito in una provetta da 2 ml, a cui sono stati aggiunti 2 ml di Proteinasi K (0.1mg/ml). Si è proceduto ad incubare a 37 °C \pm 1 °C per 60 \pm 5 minuti in agitazione, al fine di far agire l'enzima; successivamente è stata effettuata una seconda incubazione a 65 °C \pm 2 °C per 15 \pm 1 minuto, per bloccare la digestione enzimatica. Infine i campioni sono stati centrifugati a 3000xg per 5 minuti e sul sovranatante è stata eseguita l'estrazione del materiale genomico. L'RNA virale è stato ottenuto utilizzando il kit commerciale NucleoSpin RNA II (Macherey- Nagel®). In seguito è stata effettuata una reazione di Retrotrascrizione. Di seguito è stata seguita una Nested- PCR, nella quale è stato fatto ricorso a dei primer degeneri specifici per la regione ORF2 del genoma virale. Per la prima reazione è stata utilizzata la coppia di primer ORF2S1 (GACAGAATTRATTTTCGTCGGCTGG) - ORF2A1 (CTTGTCRTGYTGTTTCATAATC); per la seconda reazione si è fatto ricorso alla coppia di primer

ORF2S2 (GTGCTCTCRGCCAATGGCGAGC) - ORF2A2 (GTTCTGTGTTGTTTCATAATCCTG). Entrambe le reazioni di PCR sono state effettuate secondo quanto indicato in Tabella 1. I prodotti della reazione sono stati poi sottoposti ad elettroforesi su gel d'agarosio al 2,5% a voltaggio costante (5V/cm) per circa 40 minuti (4).

I campioni risultati positivi all'elettroforesi sono stati purificati con il kit QIAquick® Gel Extraction (Qiagen), e poi sequenziati usando il kit BigDye® Terminator Cycle (v2.0, Applied Biosystems) e l'analizzatore ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Le sequenze sono state poi assemblate utilizzando il programma SeqMan (Lasergene program package, DNASTar Inc., Madison, WI, USA) e successivamente allineate tramite il programma Clustal W. Infine, le sequenze ottenute dai segmenti amplificati del gene della polimerasi sono state analizzate grazie al database European Food-borne Viruses (per l'identificazione del genotipo virale).

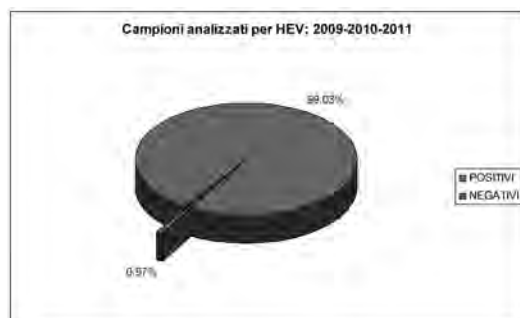
Tabella 1: profilo termico delle reazioni di Nested-PCR.

STEP	TEMPERATURA	TEMPO	N° CICLI
Denaturazione	95 °C	5 minuti	1
Denaturazione	95 °C	1 minuto	35
Annealing	55 °C	30 sec.	
Estensione	72 °C	1 minuto	
Est. finale	72 °C	10 minuti	1

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'indagine è stata condotta su 826 campioni di molluschi eduli lamellibranchi, raccolti nel periodo dal 1 Agosto 2009 al 1 Agosto 2011, analizzati per la ricerca di HEV. Grazie allo screening effettuato con la reazione di Nested-PCR è stato possibile individuare 9 campioni positivi per HEV. In secondo luogo, ciascun campione positivo è stato sottoposto a sequenziamento genico e per 8 dei 9 campioni risultati positivi è stato possibile confermare la presenza del virus. E' stato quindi registrato, come mostrato nel grafico 1, che la percentuale di positività tra i campioni analizzati è pari al 0.97%.

Grafico 1: campioni analizzati per HEV 2009-2010-2011.

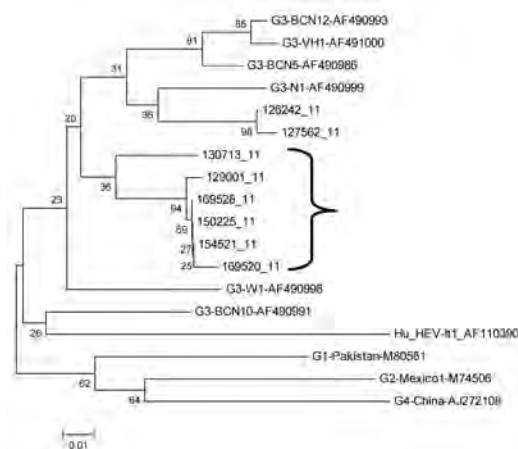


E' stato interessante notare come ci sia una distribuzione dei campioni risultati positivi non omogenea lungo i tre anni d'indagine: se nel periodo dal 1 Agosto 2009 al 31 Dicembre 2010 non è stato riscontrato alcun campione positivo, nella prima parte dell'anno 2011 si sono registrati tutti gli 8 campioni che presentano il virus. Tutti i campioni positivi provengono dalla stessa area geografica (Ferrara); questo dato potrebbe far supporre che tale zona potrebbe essere maggiormente esposta alle contaminazioni da HEV e quindi maggiormente a rischio.

E' possibile osservare come degli 8 campioni positivi, 2 campioni sono di cozze e 6 di vongole; nessun campione di ostriche è risultato positivo. I dati considerati nel presente lavoro non sono sufficienti per supporre una correlazione tra queste matrici e l'infezione dei virus, considerato che, anche se la maggioranza dei campioni positivi risulta essere vongole, queste erano anche presenti in maggior numero rispetto alle altre due matrici considerate; si renderebbe necessario uno studio con un numero di campioni rappresentativo per ogni matrice, al fine di valutare eventuali correlazioni tra queste e il virus.

Grazie all'analisi di sequenziamento genico è anche stata possibile la costruzione di un albero filogenetico tra le sequenze dei campioni risultati positivi confrontati con dei ceppi di riferimento (Grafico 2).

Grafico 2: albero filogenetico dei campioni sequenziati positivi per HEV.



Come descritto precedentemente, in Italia e in Europa il genogruppo principalmente riscontrato nei campioni biologici e in quelli suini è rappresentato dal genogruppo G3 (1). I campioni analizzati risultano appartenenti a questo stesso genogruppo. In dettaglio, è possibile evidenziare come 2 campioni (126242 e 127562) siano simili ai ceppi di riferimento G3-N1, G3-BCN5, G3-VH1 e G3-BCN12, caratteristici della Francia e della Spagna. I restanti 6 campioni (130713, 129001, 169528, 150225, 154521 e 169520) appartengono anch'essi allo stesso cluster, ma risultano avere un grado di similarità tra loro maggiore, quasi a costituire un sottogruppo. Questo dato potrebbe far supporre come, nell'ambito dell'area geografica considerata, circolino ceppi di HEV molto simili a quelli riscontrati normalmente in Italia e in Europa; inoltre la maggioranza dei campioni presentano tra loro una certa omologia, indicando come tali ceppi abbiamo trovato le condizioni ambientali ideali d'insediamento e potrebbero presentare un certo tropismo per questo tipo di matrice.

Con il presente lavoro è stato possibile evidenziare come il fenomeno delle contaminazioni da HEV nei molluschi eduli lamellibranchi non sia particolarmente rilevante. La presenza di 8 campioni positivi registrati nella stessa area e nella prima parte del 2011 invece porterebbe a considerare tale zona soggetta maggiormente alle contaminazioni da HEV. La stretta correlazione tra i ceppi analizzati può essere un dato importante dal punto di vista genetico, poiché si potrebbe ipotizzare una specificità di questi ceppi nella matrice considerata. Sarebbe quindi opportuno proseguire nel monitoraggio dei campioni per verificare il trend delle contaminazioni e le correlazioni genetiche di eventuali altri campioni positivi. In secondo luogo, sarebbe auspicabile effettuare un confronto tra i diversi campioni positivi per HEV in molluschi eduli lamellibranchi di vaste aree geografiche, anche a livello nazionale, per poter disporre di dati con maggior significato statistico che possano essere dati adeguati per compiere studi di prevalenza e di tipo genetico.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Aggarwal Rakesh, Sita Naik. 2009. Epidemiology of hepatitis E: current status. *J. Gastroenterology and Hepatology*. 24: 1484-1493.
- 2) Aggarwall Rakesh. 2011. Hepatitis E: historical, contemporary and future perspectives. *J. Gastroenterology and Hepatology*. 26: 72-82.
- 3) De Donno A., Chironna M., Craca R., Paiano A., Zizza A., Guido M., Carrozzini F., Germinario C., Gabutti G. 2003. Sieroprevalenza anti-HEV in provincia di Lecce. Università degli studi di Lecce, Università degli studi di Bari, Presidio Ospedaliero di Scorrano. 15: 199-205.
- 4) Erker J.C., Desai S.M., Mushahawar I.K. 1999. Rapid detection of Hepatitis E virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction using universal oligonucleotide primers. *J. Virol. Methods*. 81: 1-2, 109-113.

PRODUZIONE DI ENTEROTOSSINE, BIOTIPIZZAZIONE E FINGERPRINTING GENETICO IN *S. AUREUS* ISOLATO DA CAMPIONI DI FORMAGGIO IN UN SOSPETTO CASO DI MTA

Pedale R.¹, Crisetti E.¹, Addante N.¹, Normanno G.², Pedarra C.¹, Montagna C.¹, La Salandra G.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia;

²Dipartimento di Produzione Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Bari.

Key words: *Staphylococcus aureus*, MTA, PCR

ABSTRACT

The ingestion of food contaminated by enterotoxins (SEs) synthesized by *Staphylococcus aureus* is responsible of one of the most common foodborne diseases (Staphylococcal Food Poisoning- SFP). Since *S. aureus* is often involved in cases of subclinical mastitis of ruminants, milk may results contaminated. In fact, the dairy products are frequently related to cases of SFP, especially in areas characterized by a high level of consumption of these products. Consequently an active microbiological surveillance is needed in order to control the risk of SFP and to allow the improvement of the public health standards. This study reports the results of characterization of *S. aureus* strains isolated by dairy products produced in Apulia region (Southern Italy), probably responsible for an episode of food borne illnesses.

INTRODUZIONE

Molti sono i microrganismi responsabili di malattie trasmesse da alimenti (MTA) direttamente o tramite produzione di tossine (*Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Campylobacter*, Virus HAV, ecc.). Nel nostro paese l'impatto delle MTA sulla salute pubblica è certamente sottostimato, in quanto la maggior parte dei casi si manifesta in forme cliniche lievi che non comportano il ricorso alle cure mediche o, comunque, che vengono curate senza indagini microbiologiche e spesso non vengono segnalate al sistema ufficiale di notifica delle malattie infettive (8).

Tradizionalmente sono conosciuti cinque tipi antigenici classici: SEA, SEB, SEC, SED e SEE (2). Non è ancora chiaro il ruolo delle "nuove" SEs: da SEG a SEP, SEQ e SEU, nelle tossinfezioni alimentari (10).

Staphylococcus aureus rappresenta uno dei più comuni batteri che causano tossinfezioni alimentari, grazie alla sua capacità di sintetizzare negli alimenti contaminati enterotossine termostabili (SEs), resistenti alla pepsina e con peso molecolare variabile da 26 a 31 KD (8).

Le cause delle contaminazioni negli alimenti possono essere molteplici, come la manipolazione durante la lavorazione, l'interruzione della catena del freddo e le mastiti subcliniche negli allevamenti (8).

Questo studio riporta la caratterizzazione fenotipica e molecolare di ceppi di *S. aureus* isolati da campioni di formaggio a produzione artigianale, provenienti da un'azienda agricola, consumati da un nucleo familiare con sospetto di intossicazione da enterotossina stafilococcica.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati due differenti lotti di formaggio da latte misto bovino ovino e caprino con aggiunta di peperoncino e stagionatura di ca 60 gg, indicati rispettivamente lotto A e lotto B. Questi campioni provenivano da una azienda pugliese associata ad un sospetto caso di intossicazione da enterotossina stafilococcica. L'analisi per la ricerca diretta delle tossine dalla

matrice è stata eseguita secondo European screening method of the EU-RL "Coagulase Positive Staphylococci including *S. aureus*" vers.4-2010, così come previsto dal Regolamento CE 1441/2007.

Oltre alla ricerca diretta delle tossine i campioni sono stati sottoposti ad analisi microbiologiche e molecolari per la caratterizzazione dei microrganismi isolati.

L'isolamento dei ceppi di Stafilococchi coagulasi positivi (SCP) dalle matrici alimentari è stato eseguito secondo la norma EN ISO 6888 1-2 1999. I ceppi di *S. aureus* sono stati identificati con l'utilizzo del terreno CHROMagar™ Staph aureus (CHROMagar Microbiology, Paris,France) e confermati con sistema biochimico miniaturizzato API STAPH (Biomerieux). Sono stati isolati ed identificati 10 ceppi di *S. aureus*.

Ciascun ceppo è stato sottoposto a multiplex PCR per la rivelazione di 12 geni specifici per le SEs sea, seb, sec, sed, sej, see, seg, seh, sei, sem, sen, seo seguendo i protocolli modificati di diversi autori (3,4,5,9). Come controlli positivi sono stati utilizzati i ceppi di *S. aureus* ATCC 13565, ATCC 14458, ATCC 19095, ATCC 23235, e ATCC 27664. Come controllo negativo è stato utilizzato il ceppo di *S. epidermidis* ATCC 12228. Su gli isolati di *S. aureus* enterotossigeni è stata valutata l'antibiotico resistenza nei confronti di 15 antibiotici a concentrazioni prestabilite con il metodo della diffusione in agar (Kirby-Bauer), secondo le linee guida del National Committee for Clinical Laboratory Standards (7). *S. aureus* ATCC 25923 è stato utilizzato come ceppo di riferimento.

Tutti i ceppi isolati sono stati saggiati con tecniche di biologia molecolare per la ricerca del gene *mecA*, che codifica per una variante della penicillin binding protein (PBP) indicata come PBP2a e responsabile della meticillina resistenza (6). I controlli positivi e negativi usati sono rispettivamente: *S. aureus* ATCC 33591 e ATCC 25923. La biotipizzazione dei ceppi enterotossigeni è stata eseguita con il metodo descritto da Devriese, 1984 (1), utilizzando come controlli ceppi di *S. aureus* forniti dal NLR Stafilococchi Coagulasi Positivi.

Gli stipiti di *S. aureus* enterotossigeno, sono stati sottoposti all'analisi genomica mediante PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis); i DNA cromosomiale degli isolati batterici di *S. aureus* sono stati digeriti con l'enzima *SmaI*, ed i profili di restrizione analizzati mediante PFGE. Il ceppo di riferimento utilizzato per la PFGE è *S. aureus* ATCC 25923.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I due lotti di formaggio indicati A e B hanno evidenziato cariche microbiche differenti: lotto A 3,7x 10⁵ UFC/g di Stafilococchi coagulasi positivi; lotto B 600 UFC/g di Stafilococchi coagulasi negativi. Con ulteriore indagine mediante Chromagar e API Staph è stata individuata presenza di *S. aureus* nel lotto A e *S. simulans* nel lotto B. I 10 ceppi di *S. aureus* isolati del lotto A sono risultati tutti positivi per il gene produttore di enterotossina C (SEC). Inoltre la ricerca delle SEs nella matrice ha confermato l'espressione del gene sec, facendo risultare positivo il lotto A

e negativo il lotto B. Gli isolati microbici del lotto A sottoposti a prove di antimicrobico-resistenza sono risultati sensibili ai 15 antibiotici testati: penicillina (10mcg), ampicillina (10mcg), eritromicina (15mcg), tetraciclina (30mcg), sulfametoxazolo trimetoprim (23,75+1,25mcg), novobiocina (30mcg), enrofloxacin (5mcg), gentamicina (10mcg), bacitracina (10 mcg), streptomycin (10mcg), vancomycin (30mcg), teicoplanin (30mcg), oxacillin (1mcg), cefalotin (30mcg). Nessun ceppo è risultato positivo al gene *mecA*. L'analisi genomica in PFGE ha evidenziato 9 pulsotipi uguali tra di loro ed un pulsotipo differente. Questa differenza richiede ulteriori studi di genotipizzazione. La Biotipizzazione, volta a stabilire la specie di provenienza del ceppo microbico, importante ai fini di azioni preventive in autocontrollo in allevamento e in stabilimento, ha evidenziato la prevalenza del biotipo ovino confermando che la contaminazione può dipendere da mastiti subcliniche degli animali, sottolineando così, ancora una volta, la necessità di controlli efficaci negli allevamenti per una corretta gestione del rischio alimentare.

BIBLIOGRAFIA

1. Devriese, L.A. (1984). A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from animal species. *Journal of Applied bacteriology*. 1.56(2):215-20.
2. Dinges, M.M., Orwin, P.M., Schlievert, P.M., (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*, 13 16-34.
3. Jarraud S, Mougél C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J, Vandenesch F. (2002). Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infect Immun*. 70,631-41.
4. Løvseth, A., Loncarevich, S., Berdal, K.G., (2004). Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in staphylococcal isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 3869-3872.
5. Monday, S.R., Bohach, G.A., (1999). Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 3411-3414.
6. Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1991; 29(10):2240-4.
7. National Committee on Clinical Laboratory Standards (NCCLS). (2006). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria isolated from Animals. CLSI Document M31-A2. Wayne, Pennsylvania.
8. Normanno, G., La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N.C., Corrente, M., Parisi, A., Santagada, G., Firinu, A., Crisetti, E., Celano, G.V. (2007). Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*. 20,115(3):290-6.
9. Rosec JP, Gigaudo O. (2002). Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *Int J Food Microbiol*. 77,61-70.
10. Scherrer, D., Corti, S., Muehlherr, J.E., Zweifel C., Stephan R. (2004). Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. *Veterinary Microbiology*, 101, 101-107.

Lavoro svolto con i fondi RC del Ministero della Salute, IZSPB 007/09

VALIDAZIONE DI UN PANNELLO DI GENI DI RIFERIMENTO PER STUDI DI ESPRESSIONE GENICA MEDIANTE REAL-TIME qPCR IN SANGUE INTERO OVINO

Peletto S., Bertuzzi S., Campanella C., Modesto P., Maniaci M. G., Bellino C., Ariello D., Quasso A., Caramelli M., Acutis P. L.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna 148, 10154 Torino

Keywords: geni di riferimento, *Ovis aries*, sangue intero

SUMMARY

The aim of this study was to identify a set of reference genes for normalizing qRT-PCR from ovine whole blood. *SDHA*, *YWHAZ* and *HPRT* were considered the most stably expressed genes according to both geNorm and NormFinder software; furthermore, geNorm indicated *SDHA* and *HPRT* as the best reference gene combination. Our study provides a validated panel of optimal control genes which may be useful for the identification of genes differentially expressed by qRT-PCR in a readily accessible tissue, with the potential of discovering new physiological and disease markers.

INTRODUZIONE

L'utilizzo di geni di riferimento è largamente riconosciuto come l'approccio più indicato per la normalizzazione dei risultati di qRT-PCR e per ridurre possibili errori generati durante la quantificazione dell'espressione genica.

Studi volti ad identificare idonei geni di riferimento nell'ovino sono limitati ad un numero relativamente ristretto di tessuti (3, 4) e, in letteratura, non sono pubblicati lavori su sangue intero. Tuttavia il sangue costituisce una matrice analitica primaria e, in effetti, sono riportati tentativi di identificare marcatori di espressione genica nell'ovino per lo sviluppo di test in vita e la diagnosi precoce di malattie lente, come la scrapie, la cui diagnosi ancora si basa su indagini *post-mortem* (1).

Scopo del lavoro è stato di identificare geni di riferimento adeguati per la normalizzazione dei risultati di qRT-PCR in sangue intero ovino. A tal fine sono stati disegnati 11 saggi di PCR per geni comunemente utilizzati come normalizzatori e appartenenti a diverse classi funzionali e ne è stata valutata la stabilità di espressione utilizzando gli applicativi geNorm e NormFinder. Tutti gli esperimenti sono stati condotti secondo le linee guida MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (2).

MATERIALI E METODI

L'RNA totale è stato estratto da campioni di sangue intero utilizzando il kit QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen) secondo il protocollo del produttore. La purezza, concentrazione e integrità del RNA sono state valutate mediante lo spettrofotometro NanoDrop ND-1000 e il kit RNA 6000 nano LabChip su sistema Agilent Bioanalyzer 2100. Cinquecento ng di RNA totale sono stati retrotrascritti utilizzando il kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems).

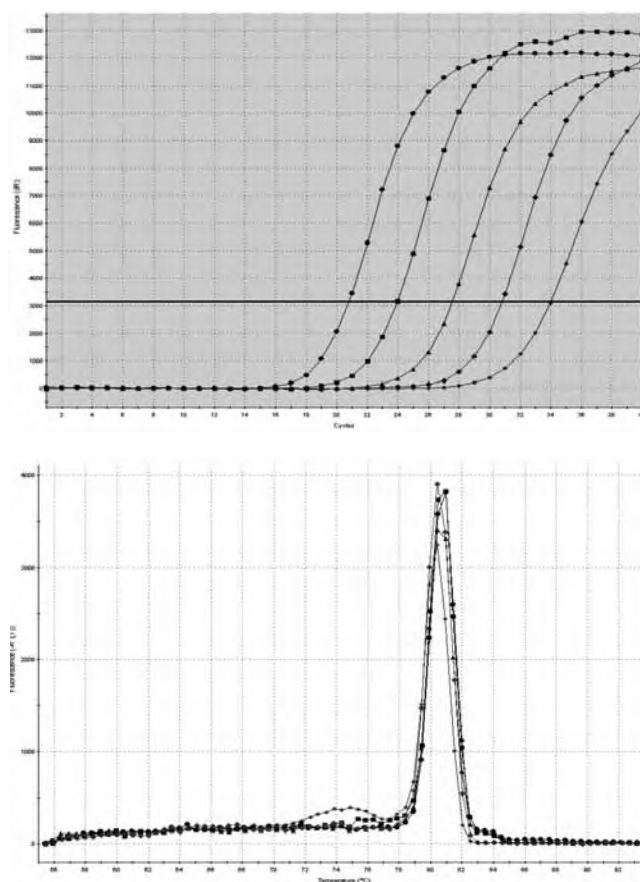
Undici geni appartenenti a diverse classi funzionali e frequentemente utilizzati come geni di riferimento sono stati selezionati per lo studio. Le sequenze dei primer per *PGK1*, *SDHA* and *G6PD* sono state desunte da precedenti pubblicazioni. Gli altri primer sono stati disegnati allineando le sequenze ovine disponibili in GenBank con gli omologhi geni dell'uomo e del bovino. I primer sono stati disegnati su esoni diversi e la loro specificità testata su cDNA e DNA genomico ovino.

Le reazioni di PCR sono state eseguite in un volume finale di 25- μ L contenente 2x Brilliant II SYBR Green Master Mix (Stratagene), 300-900 nM di ogni primer e 1 μ L of cDNA su termociclatore Mx 3005P QPCR System (Stratagene). Le efficienze di PCR sono state calcolate utilizzando curve standard derivate da pool di cDNA (Fig. 1).

RISULTATI

Tutti i geni oggetto di studio sono risultati espressi nel sangue ovino. L'amplificazione gene-specifica dei geni candidati è stata confermata dall'analisi delle curve di melting (il risultato per *YWHAZ* è illustrato a titolo esemplificativo in Fig. 1) e dal successivo sequenziamento degli amplificati. La più alta espressione è stata ottenuta per *ACTB*, *B2M* e *RPL19* con Ct medi di 14.71, 15.70 e 15.99, rispettivamente; mentre il gene meno espresso è risultato *GYPC* (Ct medio, 27.70). Per tutti i geni analizzati, le curve standard relative hanno dato coefficienti di correlazione (R^2) maggiori di 0.985 ed efficienze tra 90 e 110%.

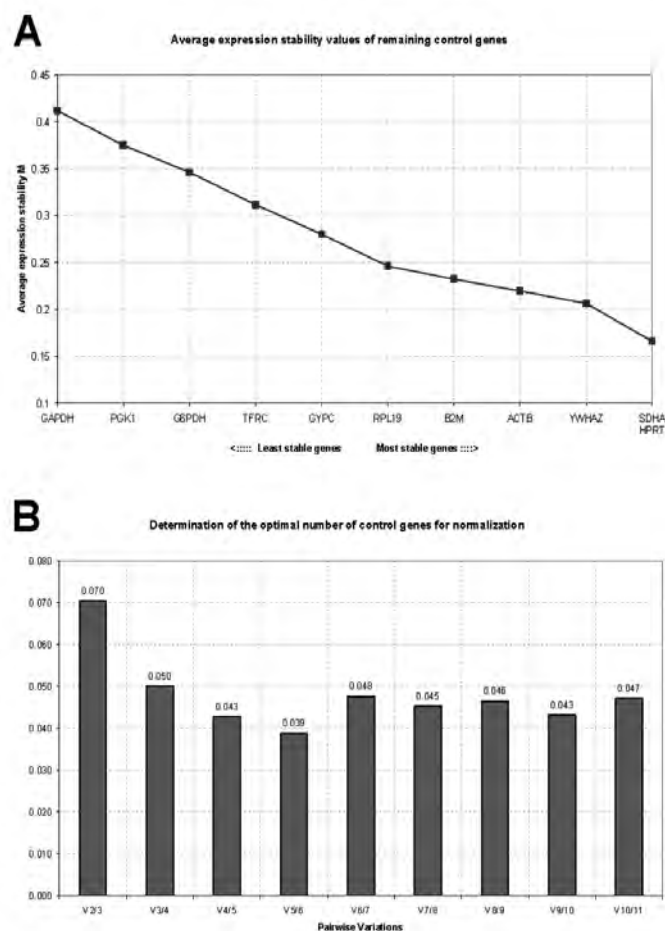
Figura 1. Analisi delle curve standard e di melting per il gene *YWHAZ*



GeNorm

La Tabella 2 riporta i valori di stabilità di espressione (M) dei geni di riferimento candidati, calcolati da geNorm. Tutti i geni analizzati hanno mostrato un'espressione stabile con valori di M bassi, sotto 0.6 (il valore soglia proposto dagli Autori del programma per definire un gene stabile è <1.5). *SDHA* si è dimostrato il gene più stabilmente espresso con un valore di M di 0.316, seguito da *YWHAZ* e *HPRT* (Tab. 1). Successivamente geNorm effettua l'esclusione graduale dei geni candidati con il peggior punteggio e determina la migliore combinazione ed il numero minimo di geni di riferimento da utilizzare. Nel pannello di geni oggetto dello studio, *SDHA* e *HPRT* rappresentano la combinazione più idonea (Fig. 2A) e l'utilizzo di due geni è sufficiente per un'accurata normalizzazione (Fig. 2B).

Figura 2. Analisi di stabilità di espressione con geNorm:
(A) Esclusione graduale dei geni candidati con valore di stabilità M più alto; (B) Determinazione del numero ottimale di geni di riferimento



NormFinder

NormFinder classifica una serie di geni candidati secondo il loro valore di stabilità (p) basato sulla similarità dei loro profili di espressione. Valori più bassi sono assegnati ai geni più stabili. La Tabella 1 riporta i risultati dell'analisi con NormFinder. L'ordine appare identico a quello determinato con geNorm, eccetto per i geni *RPL19* e *B2M*, le cui posizioni sono invertite.

Tabella 1. Geni di riferimento candidati classificati secondo la stabilità di espressione da geNorm e NormFinder

geNorm		NormFinder	
Gene	Stability value (M)	Gene	Stability value (p)
<i>SDHA</i>	0.316	<i>SDHA</i>	0.068
<i>YWHAZ</i>	0.342	<i>YWHAZ</i>	0.125
<i>HPRT</i>	0.344	<i>HPRT</i>	0.132
<i>RPL19</i>	0.361	<i>B2M</i>	0.146
<i>B2M</i>	0.362	<i>RPL19</i>	0.155
<i>ACTB</i>	0.377	<i>ACTB</i>	0.174
<i>GYPC</i>	0.412	<i>GYPC</i>	0.201
<i>TFRC</i>	0.455	<i>TFRC</i>	0.245
<i>G6PD</i>	0.486	<i>G6PD</i>	0.271
<i>PGK1</i>	0.498	<i>PGK1</i>	0.282
<i>GAPDH</i>	0.579	<i>GAPDH</i>	0.354

DISCUSSIONE

I valori di stabilità ottenuti analizzando con geNorm e Normfinder 11 geni candidati sono risultati consistenti, sebbene non identici, come riportato anche in altri lavori. *SDHA*, *YWHAZ* e *HPRT* si sono dimostrati i geni più stabilmente espressi, inoltre geNorm ha identificato *SDHA* e *HPRT* come miglior combinazione di geni di riferimento.

Sebbene i dati per la specie ovina siano ancora piuttosto limitati, *SDHA* sembra avere una buona stabilità dal momento che è risultato uno dei geni di riferimento più stabili in diversi tessuti (cervello, milza, linfonodo mesenterico e ileo) (3). Analogamente, *YWHAZ* è stato incluso in un pannello di geni di riferimento ottimali in cervello, obex e ileo (3). La stabilità di espressione di *HPRT* è stata valutata solo in polmone e arteria polmonare, dimostrando una bassa stabilità in entrambi i tessuti (4). Al contrario, *HPRT* si è classificato come terzo gene più stabile nel sangue intero, enfatizzando la necessità di un'adeguata validazione dei geni di riferimento in ogni tessuto di interesse per una corretta interpretazione dei risultati di qRT-PCR. Degno di nota il risultato ottenuto per *GYPC*, la cui espressione nell'uomo è considerevolmente più alta nella linea eritroide rispetto alle cellule non eritroidi. *GYPC* è stato, infatti, utilizzato da Brown *et al.* (2007) per normalizzare i risultati di qRT-PCR su marcatori eritroidi per la diagnosi *in vivo* di scrapie da sangue ovino. Nel nostro studio, tuttavia, sia geNorm che NormFinder hanno classificato *GYPC* tra i geni meno stabili, dimostrando che geni ubiquitariamente espressi avrebbero permesso una misurazione più valida dell'espressione genica. Un aspetto distintivo del nostro studio è l'attenzione posta al disegno di primer localizzati su esoni diversi, comprendenti almeno un introne. Questo aspetto è stato piuttosto trascurato nei precedenti lavori di selezione di geni di riferimento, probabilmente a causa della scarsità di sequenze genomiche ovine nei database pubblici. Tuttavia, tale approccio è altamente raccomandato, in combinazione con il trattamento con DNasi I, per evitare/riconoscere la co-amplificazione di DNA genomico contaminante. Inoltre, effettuando una ricerca in RTPrimerDB (<http://www.rtprimerdb.org>), database di riferimento per qRT-PCR primer, di 8220 coppie di primer

per 5691 geni di 22 organismi, disponibili al momento della stesura di questo abstract, solo quattro saggi di SYBR Green PCR erano depositati per *Ovis aries*. Un risultato addizionale del nostro studio è quindi un set di primer validati, idonei per esperimenti di espressione genica basati sulla chimica SYBR Green anche in altri tessuti o cellule.

In conclusione, *SDHA*, *YWHAZ* e *HPRT* rappresentano geni di riferimento ottimali per studi di espressione genica su sangue intero ovino e la media geometrica (5) di due geni stabili è un fattore di normalizzazione accurato. I risultati del nostro studio costituiscono una base per l'identificazione di geni differenzialmente espressi in una matrice facilmente accessibile, con la potenzialità di scoprire nuovi marker fisiologici e di malattia e di migliorare tratti produttivi (ad es., identificando eQTLs - expression Quantitative Trait Loci).

BIBLIOGRAFIA

1. Brown, A.R.; Blanco, A.R.; Miele, G.; Hawkins, S.A.; Hopkins, J.; Fazakerley, J.K.; Manson, J.; Clinton, M. Differential expression of erythroid genes in prion disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, 364, 366-371.
2. Bustin, S.A.; Benes, V.; Garson, J.A.; Hellems, J.; Huggett, J.; Kubista, M.; Mueller, R.; Nolan, T.; Pfaffl, M.W.; Shipley, G.L.; Vandesompele, J.; Wittwer, C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 2009, 55, 611-622.
3. Garcia-Crespo, D.; Juste, R.A.; Hurtado, A. Selection of ovine housekeeping genes for normalisation by real-time RT-PCR; analysis of PrP gene expression and genetic susceptibility to scrapie. *BMC Vet. Res.* 2005, 1, 3.
4. Passmore, M.; Nataatmadja, M.; Fraser, J.F. Selection of reference genes for normalisation of real-time RT-PCR in brain-stem death injury in *Ovis aries*. *BMC Mol. Biol.* 2009, 10, 72.
5. Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002, 3, research0034:1-11.

CROMO: SVILUPPO E VALIDAZIONE DI UN METODO DI ANALISI NEI MANGIMI IN ICP-MS

Pellegrino M., Tarasco R., Gavinelli S., Palmegiano P., Brizio P., Leogrande M., Fioravanti F., Squadrone S., Abete M. C.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino

Key words: Cromo, Mangimi, Oligoelementi.

INTRODUZIONE

Il cromo è un elemento essenziale ubiquitario, che esiste in alcuni stati di ossidazione stabili (0, +3, +6) ed altri meno stabili (+2, +4, +5).

Nell'ambiente naturale in presenza di acqua ed ossigeno vi è equilibrio tra specie tri ed esavalenti. Tutti i composti del cromo trivalente sono facilmente ossidabili a composti del cromo esavalente in ambiente alcalino, mentre in ambiente acido tende ad avvenire il processo opposto.

La concentrazione di cromo nel suolo risulta estremamente variabile (da pochi mg/kg ad alcune centinaia di mg/kg), a seconda delle caratteristiche geologiche dei terreni, dalla eventuale contaminazione di origine industriale. Il cromo è infatti usato nell'industria galvanica, nell'industria metallurgica, etc.

Il cromo trivalente è un elemento essenziale necessario per numerose funzioni, in particolare è stato dimostrato un ruolo attivo nella sintesi del fattore inducente tolleranza al glucosio, necessario per l'azione periferica dell'insulina. L'introduzione alimentare giornaliera necessaria è dell'ordine dei 60-70 microgrammi, quantità garantita, senza alcun problema, dalle normali diete.

Il cromo trivalente, stabile e poco reattivo, non può attraversare le membrane cellulari per cui è considerato privo di pericolosità per tessuti e DNA. Il cromo esavalente è invece altamente reattivo, ha un elevato potenziale ossidativo, attraversa facilmente le membrane ed ha proprietà fortemente irritanti-corrosive, sensibilizzanti, mutagene e cancerogene. La patologia da cromo esavalente è essenzialmente cronica e da esposizione professionale. Il cromo è tossico per contatto cutaneo o per inalazione. Se assorbito per via gastroenterica si riduce rapidamente e interamente a cromo trivalente con un meccanismo di regolazione omeostatica.

Il cromo non è autorizzato quale additivo in alimentazione animale e non rientra tra le sostanze indesiderabili per le quali è previsto un limite massimo di accettabilità. Nel PNAA del 2004 il Ministero della Salute indicava che, sulla base di dati preliminari in letteratura, nei mangimi si ritenevano sospetti valori di cromo totale che superavano 3 ppm e 5 ppm nel mangime per le galline ovaiole per la presenza di carbonato di calcio; nelle premiscele livelli superiori a 40 ppm erano da considerarsi indicazione di possibile aggiunta volontaria. Tenuto conto della sua diffusione nell'ambiente la Regione Piemonte ha deciso di integrare i controlli sugli alimenti ad uso zootecnico prevedendo l'inserimento di questo elemento tra quelli da ricercare. A tal fine si è reso necessario lo sviluppo e la validazione di un metodo in ICP-MS per la sua determinazione.

MATERIALI E METODI

Sono stati determinati i parametri strumentali ottimali per la determinazione del cromo.

E' stata valutata, quindi, la linearità strumentale analizzando per tre volte di seguito 4 soluzioni di taratura alla concentrazione di 1 ppb, 5 ppb, 20 ppb e 50 ppb e costruendo una retta di taratura media: il coefficiente R^2 ottenuto è $>0,990$, tutti i rapporti y/x sono compresi nell'intervallo $(y/x)_{medio} \pm 10\%$ e l'intercetta

ottenuta non è significativamente diversa da 0.

Per il calcolo del recupero e della precisione del metodo sono state eseguite 18 prove suddivise in tre livelli di concentrazione, utilizzando sia Materiali di Riferimento Certificati (TEA GBW 10016 conc. di Cromo 0,45 mg/Kg e AQUATIC PLANT CRM 596 conc. di Cromo 36,3 mg/Kg) sia campioni di mangime positivamente (concentrazione di Cromo 2,8 mg/Kg).

Le prove sono state condotte mineralizzando i campioni in forno a microonde ad alta pressione in presenza di una miscela di acido nitrico ultrapuro concentrato (7 mL), perossido di idrogeno al 30% (1,5 mL) e acido fluoridrico ultrapuro concentrato (0,05 mL).

Si è quindi proceduto alla verifica del campo di misura del metodo utilizzando un mangime positivamente (concentrazione di Cr 300 mg/Kg).

L'incertezza di misura è stata calcolata in base alla Procedura Gestionale Standards in uso presso l'IZS PLV e alla Linee guida degli IZZSS, che prevedono l'identificazione dei contributi all'incertezza di misura ed il loro calcolo:

- incertezza di ripetibilità – determinata mediante 6 prove indipendenti su Mangime positivamente a 2,8 mg/kg.
- incertezza del recupero – determinata mediante 6 prove indipendenti su Mangime positivamente a 2,8 mg/kg.
- incertezza dovuta alla pesata – derivante dal rapporto di taratura della bilancia
- incertezza dovuta ai volumi – derivante dalle tolleranze massima ammessa della pipetta
- incertezza dovuta alla curva di taratura – contributo della curva di calibrazione eseguita nelle prove di validazione
- incertezza dovuta al Materiale di Riferimento – incertezza dichiarata della soluzione standard multielemento e monoelemento utilizzate.

RISULTATI

Nella tabella 1 sono indicate i parametri strumentali dell'ICP-MS:

Tabella 1 – Condizioni strumentali

Nebulizzatore:	concentrico di Meinhard
Spray chamber:	ciclonica in quarzo con raffreddamento ad effetto Peltier.
Generatore RF:	potenza 1400 W
Flusso di Ar:	nebulizzatore 0.7-1.2 L/min
Sample flush:	40 (s)
Sample flush speed:	30 rpm
Read delay:	35 (s)

Delay speed:	60 rpm
Analysis speed:	30 rpm
Wash:	35 (s) H ₂ O U.P. + soluzione HNO ₃ 1%
Wash speed:	60 rpm
Condizioni di scanning:	Dwell time 10 ms, sweeps/reading 100, readings/replicate 1, number of replicate 3
Standard interno:	¹¹⁵ In (100 µg/L)
Gas di reazione:	Miscela di Elio (97%) – Idrogeno (3%) ultrapuri.
Flusso:	0.4 mL/min

Nella tabella 2 vengono indicati i risultati delle prove di recupero effettuate sui due Materiali di Riferimento Certificati e sul mangime positivamente.

Tabella 2 – Prove di recupero

livello	Conc. Certif./ pos. (mg/Kg)	Conc. media ottenuta (mg/Kg)	Scarto tipo (mg/ Kg)	Recupero per livello	Recupero totale
1	0,45	0,452	0,013	100,44%	98,53%
2	2,8	2,847	0,046	102,75%	
3	36,3	33,536	1,114	92,39%	

Le prove di precisione sono state ottenute quantificando ciascun livello a fronte di una retta media ottenuta ponendo in ordinata i segnali strumentali e in ascissa le concentrazioni nominali: i valori di RSD% di ripetibilità ottenuti sono conformi ai requisiti richiesti (limite accettabilità RSD< 10%).

Nella tabella 3 vengono indicati i contributi dell'incertezza di misura e il valore finale dell'incertezza estesa del risultato

Tabella 3 – Incertezza di misura

COMPONENTE	Contributo
Incetezza relativa di Ripetibilità	0,00660
Incetezza relativa del Recupero	0,04018
Incetezza relativa Volume (pipetta)	0,00245
Incetezza relativa Pesata	0,00034
Incetezza relativa Curva di taratura	0,00709
Incetezza relativa Materiale di Riferimento1	0,00115
Incetezza relativa Materiale di Riferimento2	0,00200
Somma contributi al quadrato	0,001720

Numero prove ripetibilità	6
Numero prove routine	2
Gradi di libertà effettivi	6
Incetezza composta relativa	0,04147
Fattore di copertura K	2,57
Incetezza estesa relativa del metodo	11%
Incetezza estesa relativa del risultato	17%

CONCLUSIONI

La riferibilità, la rintracciabilità e la confrontabilità delle misure viene assicurata mediante l'utilizzo di materiali di riferimento ed il calcolo dell'incetezza di misura.

I dati ottenuti dalle prove di validazione permettono quindi di dichiarare l'idoneità del metodo per gli scopi prefissati in quanto stabiliscono e definiscono le caratteristiche ed i limiti del metodo stesso.

BIBLIOGRAFIA

1. Regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali.
2. Regolamento (CE) n. 152/2009 della Commissione del 27 gennaio 2009 che fissa i metodi di campionamento e di analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali.

SUMMARY

The demand for rapid and sensitive analytical methods for the determination of chemical forms of toxic elements in environmental samples is increasing. Chromium salts are used extensively in several industrial processes, and enter water supplies through the discharge of effluents from corrosion inhibitors and water-cooled heat exchange systems, and also from electroplating, tanning, dyeing, textile, cement, and chemical industries.

Piedmont Region determined to investigate the presence of these elements in feedstuffs, due to its spreading in the environment.

We developed a method for the detection of Chromium in feeding stuffs by ICP-MS.

The validation process was performed according European Regulation 882/2004 considering the following parameters: linearity, specificity, LOQ, repeatability and reproducibility, trueness and uncertainty of measurement. The validated technique according to these principles is consistent with the requirements of the ISO 17025 and it is suitable for quantitative official analysis.

IDENTIFICAZIONE DI PATOGENI IN UN ALLEVAMENTO DI BOVINE DA LATTE MEDIANTE METODO IN MULTIPLEX REAL-TIME PCR

IDENTIFICATION OF PATHOGEN IN A BOVINE MILK FARM BY MULTIPLEX REAL-TIME PCR

¹Petruzzelli A., ²Amagliani G., ¹Foglini M., ¹Oraziotti N., ¹Mancini P., ³Omiccioli E., ²Brandi G., ¹Tonucci F.

¹IZSUM-Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche, Italy

²Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Università di Urbino "Carlo Bo", Urbino, Italy

³Diatheva, Fano, Italy

Key words: Raw milk, multiplex Real-Time PCR, proficiency testing

SUMMARY

Law provisions about direct sell of raw bovine milk require pathogen monitoring in bovine milk farms (milk and faeces). It has been showed that culture-based methods used for this scope, besides being cumbersome and time-consuming, may be also less sensitive, compared to molecular approaches. In this study, a multiplex Real-Time PCR, able to identify VTEC O157, *Salmonella* spp and *Listeria monocytogenes*, has been used to analyse milk, filter, sewage and stool samples from a milk farm, in comparison with standard methods. The performances of the molecular protocol have been preliminary assessed with lyophilized samples from proficiency testing VLA, showing 100% accordance. Results from field samples indicated the absence of the pathogen in milk, and the higher sensitivity of Real-Time PCR with other matrices, suggesting its potential use for fast pathogen identification.

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni si è posta particolare attenzione alla contaminazione da patogeni nel latte crudo bovino in seguito alla diffusione di distributori automatici che ne consentono la vendita diretta al consumatore. La normativa relativa alla commercializzazione diretta di latte crudo (Intesa Stato-Regioni n 5/CSR del 25 gennaio 2007) ribadisce la necessità di monitorare la presenza di germi patogeni nel latte e di *E. coli* O157 anche nelle feci in quanto il controllo del solo prodotto finito non garantisce una riduzione significativa del rischio per il consumatore. Buone pratiche igieniche di allevamento, soprattutto nella fase di mungitura, riducono drasticamente la possibilità di contaminazione del latte (1). Allo stesso tempo, l'applicazione di metodi diagnostici rapidi per l'identificazione di germi patogeni permette di attivare misure di controllo tempestive finalizzate alla prevenzione di eventuali eventi epidemici. L'indagine condotta ha lo scopo di valutare la presenza di microrganismi patogeni in un allevamento autorizzato alla vendita diretta di latte crudo e l'efficacia di un metodo di identificazione molecolare in Multiplex Real-Time PCR su matrici complesse (feci, filtri, liquami).

MATERIALI E METODI

Campionamento

L'indagine è stata svolta nel periodo luglio 2009-settembre 2009, marzo 2010-luglio 2010 presso un allevamento della provincia di Pesaro-Urbino. Sono stati prelevati, da tank di stoccaggio, 27 campioni di latte in 5 unità campionarie (per un totale di 135 campioni), 25 filtri del sistema di filtrazione del latte, 47 pool (da 5 bovine) di feci e 29 campioni di liquami.

Attività analitica

Metodo colturale: Tutti i campioni sono stati esaminati con metodo ELFA per la presenza di *E. coli* O157 (VIDAS *E. coli* O157 ECO, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France; AFNOR BIO n.12/08-07/00). Latte e filtri sono stati analizzati con metodo ELFA anche per la

presenza di *Salmonella* spp. (VIDAS *Salmonella* SLM; AFNOR BIO n. 12/16-09/05), *Listeria monocytogenes* (VIDAS *L. monocytogenes* LMO2; AFNOR BIO n.12/11-03/04) e *Campylobacter* spp. (VIDAS *Campylobacter* CAM). I campioni di latte e filtri sono inoltre stati esaminati per la numerazione di microrganismi a 30°C (UNI EN ISO 4833:2004) utilizzando Milk Agar (latte) e Plate Count Agar (PCA) (filtri). Solo i campioni di latte sono stati analizzati per la numerazione di *Staphylococcus* spp. coagulasi positivi (UNI EN ISO 6888-2:2004). I campioni sospetti positivi sono stati sottoposti a test di conferma. Per *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. sono stati condotti i metodi indicati rispettivamente nella UNI EN ISO 6579:2008 e nella ISO 10272-1:2006. Per *E. coli* O157 i campioni in arricchimento sono stati esaminati in McConkey Agar con Sorbitolo, Cefixime, e Tellurite (CT SMAC, Biolife, Milano, Italy); l'identificazione delle colonie tipiche è stata effettuata attraverso API ID 32 E (bioMérieux), siero monovalente anti-O157 (Siemens Healthcare, Marburg, Germany) e anti-H7 (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark). Per *L. monocytogenes* i campioni arricchiti in Fraser Broth sono stati esaminati su OXFORD Agar e ALOA Agar e la successiva identificazione è stata effettuata mediante colorazione di Gram, test della catalasi, della β -emolisi e API Listeria (bioMérieux). Le colonie di *Staphylococcus* spp. coagulasi positive sono state identificate come *S. aureus* attraverso il test del Rosso Metile-Voges Proskauer.

Metodo molecolare: Tutti i campioni sono stati testati con terreno di arricchimento colturale Multipathogen Enrichment Medium (MEM, DIATHEVA) formulato per la crescita simultanea bilanciata di *E. coli* O157, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. Aliquote (400 μ l) delle culture di prearricchimento sono state utilizzate per l'estrazione del DNA totale con il GenElute Mammalian Genomic DNA Purification KIT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Ogni campione di DNA estratto (5 μ l) è stato amplificato mediante una Multiplex Real-Time PCR (MultipathogenFLUO Kit-DIATHEVA) (2,3) che permette la rilevazione simultanea dei tre patogeni citati, in presenza di un controllo interno di amplificazione (IAC). La presenza di tale sistema di controllo ha permesso di escludere la possibilità di risultati falsi negativi dovuti ad eventuali inibitori di PCR (EN ISO 22174).

Proficiency testing del metodo molecolare: Il metodo molecolare è stato formulato specificatamente per campioni alimentari; al fine di verificare l'affidabilità del metodo anche su matrici complesse differenti, è stato condotto un proficiency test su campioni liofilizzati (feci, tessuti, fluidi, tamponi) contaminati artificialmente con un ceppo non tossigeno di *E. Coli* O157. I campioni (4 campioni distinti) ottenuti dal VLA (Veterinarian Laboratories Agency, UK) sono stati ricostituiti in mTSB ed analizzati in parallelo per la presenza di *E. coli* O157 con il metodo OIE (2008) e protocollo molecolare. Da ciascun prearricchimento in mTSB sono state effettuate 6 estrazioni e amplificazioni indipendenti per un totale di 24 reazioni.

RISULTATI

Latte: Tutti i campioni sono risultati negativi per la presenza di microrganismi patogeni. La media geometrica mobile delle cariche a 30°C è risultata sempre nei limiti di accettabilità (≤ 50.000 ufc/ml) (Intesa Stato Regioni 5/CSR 25 gennaio 2007). *S. aureus* è risultato inferiore a 100 ufc/ml (Tab. 1).

Filtri: Tutti i campioni sono risultati negativi per *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. In due campioni è stata rilevata la presenza di *L. monocytogenes* sia con il metodo colturale che con quello molecolare. Sette campioni erano inizialmente risultati positivi per *E. coli* O157 in VIDAS *E. coli* O157, tuttavia, solo uno di essi (prevalenza del 4%) è risultato positivo in seguito alle prove di conferma. L'analisi in Real-Time PCR ha invece permesso di identificare 12 campioni positivi per questo patogeno (48%) (Tab. 1). Inoltre non è stata riscontrata correlazione fra la presenza del patogeno e la carica mesofila dei filtri (SPC) (Fig. 1)

Feci e liquami: Il metodo ELFA ha rilevato 14 presunti positivi tra i campioni di liquami e 17 di feci. Dopo i test di conferma, i campioni positivi per *E. coli* O157 sono risultati 2 (7%) di liquami e 2 (4%) di feci. Il saggio di Real-Time PCR ha invece rilevato il patogeno in 27 (93%) campioni di liquami e in 28 (60%) di feci (Tab. 1).

Proficiency testing: Si è ottenuta una completa concordanza dei risultati ottenuti con metodo molecolare e colturale (OIE/2008) (Tab 2).

Tab.1: Risultati metodo colturale e molecolare su campioni di latte, filtri, feci e liquami

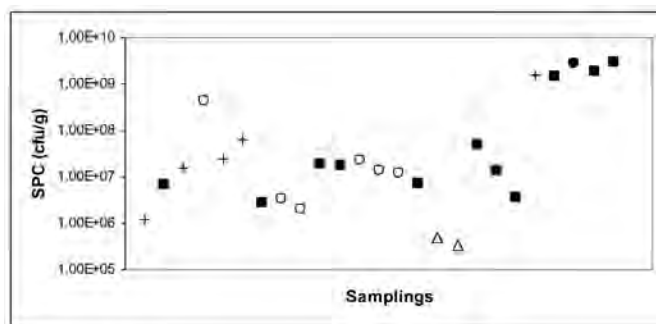
Matrice	Determinazioni	ELFA positivi	Conferma ELFA	RT PCR
Latte	<i>E. coli</i> O157	0/27	na*	0/27
	<i>Salmonella</i>	0/27	na*	0/27
	<i>L. monocyt.</i>	0/27	na*	0/27
	<i>Campylobacter</i>	0/27	na*	0/27
Filtri	<i>E. coli</i> O157	7/25	1/25	12/25
	<i>Salmonella</i>	0/25	0/25	0/25
	<i>L. monocyt.</i>	2/25	2/25	2/25
	<i>Campylobacter</i>	0/25	0/25	0/25
Feci	<i>E. coli</i> O157	17/47	2/47	27/29
Liquami	<i>E. coli</i> O157	14/29	2/29	15/16

*I negativi non devono essere confermati con il colturale

Tab.2: Proficiency testing. Risultati del metodo OIE e molecolare

Identificativo campione	Metodo OIE	Real-Time PCR
11/1135	Neg	0/6
11/1136	Pos	6/6
11/1137	Neg	0/6
11/1138	Pos	6/6

Fig. 1: Correlazione tra presenza di *E. coli* O157 e carica mesofila dei filtri



- *Camp. negativi*
- △ *Camp. positivi a L. monocytogenes*
- + *Camp. positivi in PCR*
- *Camp. positivi in VIDAS ECO e PCR, non confermati al colturale*
- *Camp. positivi in VIDAS ECO e PCR confermati al colturale*

DISCUSSIONE

L'assenza di germi patogeni nel latte ha dimostrato un'elevata salubrità della matrice esaminata. I risultati positivi riscontrati nei filtri, liquami e feci dovrebbero essere riconducibili alla presenza di carrier intestinali di *E. coli* O157 all'interno dell'allevamento, tuttavia l'assenza del patogeno nella matrice latte dimostra una corretta applicazione delle buone pratiche di allevamento nella fase di mungitura, filtrazione, refrigerazione e stoccaggio. I risultati del proficiency test con materiale certificato hanno dimostrato l'efficienza del metodo molecolare anche su campioni non alimentari (feci, tessuti, liquami) di origine bovina.

Il confronto dei risultati ottenuti con il metodo colturale e molecolare ha rilevato una perfetta concordanza per *L. monocytogenes* ed una maggiore sensibilità dell'approccio molecolare per *E. coli* O157. Una rilevante diminuzione dei valori di positività è stata riscontrata comparando i risultati del VIDAS *E. coli* O157 ECO con quelli ottenuti dopo conferma. L'inserimento di uno step per l'immunocentrificazione potrebbe essere utile ad aumentare la sensibilità del metodo colturale (4). La Multiplex Real-Time PCR ha dimostrato elevata sensibilità anche con le matrici più complesse. Inoltre l'applicazione del metodo molecolare su campioni arricchiti in coltura assicura la vitalità dei germi identificati. Il metodo molecolare proposto presenta, inoltre, il vantaggio aggiuntivo di una notevole riduzione dei tempi di risposta e del carico di lavoro importanti per effettuare diagnosi precoci ed interventi sanitari tempestivi.

BIBLIOGRAFIA

- Decastelli L., Ru G., Brizio G., Gentile D., Gallina S., Caprioli A, 2004. Presenza di *E. coli* O157 in suini alimentati con latte di siero. Il progresso Veterinario. 2: 76-78.
- Anonymous, 2005. Polymerase Chain Reaction (PCR) for the Detection of Food Borne Pathogens e General Requirements and Definitions. EN ISO 22174. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Omiccioli E., Amagliani G., Brandi G., Magnani M, 2009. A new platform for Real-Time PCR detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157 in milk. Food Microbiol. 26: 615-22.
- Silvestro, L., M. Caputo, S. Blancato, L. Decastelli, A. Fioravanti, R. Tozzoli, S. Morabito, and A. Caprioli, 2004. Asymptomatic carriage of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in farm workers in Northern Italy. Epidemiol. Infect. 132, 915-919.

LA RETE DEL CONTROLLO DEI TRATTAMENTI ILLECITI CON METODO ISTOLOGICO: UN SISTEMA AFFIDABILE ED EFFICACE

Pezzolato M., Maurella C., Varello K., Richelmi G. B., Maldera O., Mascarino D., Audino V., Ingravalle F., Caramelli M., Bozzetta E.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta- SC Istopatologia e Test Rapidi, Torino

Key words: Ring test, trattamenti illeciti, bovini

SUMMARY

An inter-laboratory circuit was organised to verify the performance of the Istituti Zooprofilattici net on the application of the histopathological test used to detect illicit hormonal treatments in cattle, as provided in Italian National Control Program. Thirty-six histological slides of positive and negative reference tissues for each target organ (thymus, thyroid, prostate, bulbo urethral gland) were sent to IIZZSS. Good value of agreement and accuracy for each laboratory were obtained, comparable to those resulting from routine tests used in food protection and animal health control.

INTRODUZIONE

Nell'ambito dei piani ufficiali di monitoraggio dei trattamenti illeciti con promotori della crescita negli animali in produzione il numero di positività riscontrate permane molto basso, malgrado si mantengano costanti i sequestri di preparazioni vietate da parte delle autorità preposte ai controlli. Questa situazione indica l'inefficacia del sistema di controllo a fronte di trattamenti sempre più sofisticati e complessi somministrati a bassi dosaggi. Il miglioramento degli strumenti di indagine risulta pertanto urgente, soprattutto per una stima dell'effettiva prevalenza del fenomeno e per studi di analisi del rischio per l'uomo. In quest'ottica è necessario prevedere il superamento dell'approccio "target-based" e privilegiare tecniche diagnostiche ad ampio spettro, in grado di identificare categorie di molecole in seguito alla dimostrazione delle modificazioni biologiche indotte dalle stesse. Per questa finalità dal 2009 il PNR prevede l'esame istologico quale strumento per rilevare non già la presenza della sostanza, quanto le alterazioni che la somministrazione di sostanze illecite può causare in alcuni organi bersaglio dei bovini. Le performance dei laboratori degli IIZZSS relativamente al metodo istologico sono pertanto state valutate in termini di accuratezza e riproducibilità

MATERIALI E METODI

STUDIO DI RIPRODUCIBILITA'

1. Partecipanti

Sono stati invitati a partecipare gli istopatologi appartenenti ai laboratori competenti dei 10 IIZZSS (Istituti Zooprofilattici Sperimentali);

2. Preparazione dei campioni

Sono stati utilizzati per la valutazione sezioni di organi bersaglio di riferimento (timo – tiroide – prostata - ghiandole bulbo uretrali) di bovini (vitelli e vitelloni) forniti dal laboratorio di Istologia dell'IZS di Torino e dall' IZS delle Venezie, ottenuti da animali sottoposti ad un trial sperimentale.

Si sono allestiti complessivamente 3 set composti da vetrini contrassegnati con un numero progressivo da 1 a 36 per ogni organo o gruppo di organi indicativi di un trattamento (36 timi- 36 tiroidi- 36 prostate e 36 ghiandole bulbo uretrali). L'assegnazione della numerazione a ciascun set di campioni

è stata eseguita dal laboratorio di Istologia dell'IZS di Torino secondo opportuni criteri di randomizzazione.

3. Consegna dei campioni

Ciascun set da 144 campioni è stato inviato ai referenti IIZZSS per il PNR istologico 2010 durante il corso dell'anno con il protocollo includente gli obiettivi dello studio ed i tempi necessari per l'espletamento dello stesso

4. Saggio dei campioni presso i singoli analisti

Ogni laboratorio ha fornito le letture dei campioni del set sia informaticamente, mediante la compilazione del foglio predisposto, sia su supporto cartaceo mediante la compilazione delle opportune schede di lettura.

5. Espressione dei risultati e trasmissione degli esiti

L'espressione dei risultati del PNR ISTOLOGICO 2010 è così riassunta:

TIMO

LESIONE	ESITO	ESITO
Atrofia	Bovino < 8 mesi	Bovino 8-24 mesi
Assente-lieve	Non sospetto	Non sospetto
Moderata	Sospetto	Non sospetto
Grave	sospetto	Sospetto

TIROIDE

LESIONE	ESITO
Ipoplasia diffusa	
Assente	Negativo
Presente	Sospetto

PROSTATA: ghiandola disseminata

LESIONE	ESITO
Normale/iperplasia	Negativo
Metaplasia	Sospetto

GH. BULBO URETRALI: dotti

LESIONE	ESITO
Normale/iperplasia	Negativo
Metaplasia	Sospetto

GH. BULBO URETRALI :tessuto ghiandolare

LESIONE	ESITO
Normale/iperplasia	Negativo
Metaplasia	Sospetto

Gli esiti delle analisi, riportati nell'apposito modulo di risposta, sono stati trasmessi al BEAR dell'IZS.

Il set di vetrini e le schede cartacee sono state riconsegnate entro un mese dal ricevimento al laboratorio inviante, il quale dopo opportuna riidentificazione dei campioni ha proceduto a spedire il set ad un altro laboratorio

6. Analisi statistica

Per la valutazione della riproducibilità (o concordanza) è stato calcolato il kappa (k) di Cohen (2) per ogni coppia di lettori ed il k-combined per l'intera rete diagnostica, utilizzando il software STATA 10.1.

La numerosità campionaria $n=36$ è stata determinata in modo tale che, in caso di perfetta concordanza dei laboratori ($k = 1$), il limite inferiore dell'IC95% fosse superiore a 0,65.

Parallelamente alla valutazione della precisione del metodo, si è potuto procedere anche alla valutazione dell'accuratezza poiché per l'allestimento dei set si sono utilizzati tessuti di riferimento positivi e negativi.

Inoltre sono stati separati i campioni di prostata da quelli delle ghiandole bulbo uretrali per verificare in maniera indipendente la loro accuratezza nell'individuare correttamente i campioni provenienti dagli animali trattati e dai controlli, mentre nel caso della tiroide è stata valutata soltanto la riproducibilità in quanto non era disponibile materiale di riferimento per valutare l'accuratezza.

RISULTATI

Complessivamente hanno aderito al ring test 9 laboratori.

Nelle successive tabelle 1 e 2 viene riportato il valore di riproducibilità per ogni laboratorio rispetto a tutti gli altri e per singolo trattamento (tab. 2) ed il k-combined per l'intera rete diagnostica (tab. 1),

Tab. 1: K-combined per organo

ORGANO	K DI COHEN
Bulbo uretrali	1 (IC95% 0.95-1)
Prostata	0.69 (IC95% 0.91-1)
Timo	0.68 (IC95% 0.62-0.74)
Tiroide	0.83 (IC95% 0.77-0.88)

Tab. 2: K-overall per singolo laboratorio e per organo

Lab.	Bulbo uretrali	Timo	Prostata	Tiroide
1	1 (IC95% 0.95-1)	0.74 (IC95% 0.63-0.86)	0.98 (IC95% 0.86-1)	0.88 (IC95% 0.77-0.99)
2	1 (IC95% 0.95-1)	0.73 (IC95% 0.61-0.8)	0.98 (IC95% 0.86-1)	0.69 (IC95% 0.58-0.8)
3	1 (IC95% 0.95-1)	0.63 (IC95% 0.52-0.75)	0.98 (IC95% 0.86-1)	0.88 (IC95% 0.77-0.99)
4	1 (IC95% 0.95-1)	0.44 (IC95% 0.32-0.55)	0.98 (IC95% 0.86-1)	0.88 (IC95% 0.77-0.99)
5	1 (IC95% 0.95-1)	0.69 (IC95% 0.58-0.81)	0.98 (IC95% 0.86-1)	0.88 (IC95% 0.77-0.99)
6	1 (IC95% 0.95-1)	0.69 (IC95% 0.58-0.80)	0.98 (IC95% 0.86-1)	0.67 (IC95% 0.56-0.77)
7	1 (IC95% 0.95-1)	0.69 (IC95% 0.58-0.80)	0.98 (IC95% 0.86-1)	0.67 (IC95% 0.56-0.77)
8	1 (IC95% 0.95-1)	0.76 (IC95% 0.64-0.87)	0.83 (IC95% 0.72-0.95)	0.88 (IC95% 0.77-0.99)
9	1 (IC95% 0.95-1)	0.78 (IC95% 0.66-0.89)	0.98 (IC95% 0.86-1)	0.88 (IC95% 0.77-0.99)

Nelle tabelle 3, 4 e 5 sono espressi i valori di sensibilità e specificità ottenuti dal confronto delle letture dei singoli laboratori con i gold standard provenienti dalla sperimentazione clinica.

Tab. 3: Valori di accuratezza ottenuti nell'identificazione delle modificazioni indotte nelle ghiandole Bulbo Uretrali dal trattamento con ormoni steroidei maschili

GHIANDOLE BULBO-URETRALI				
Lab.	Sensibilità	IC95%	Specificità	IC95%
1	100	(83.9-100)	100	(78.2-100)
2	100	(83.9-100)	100	(78.2-100)
3	100	(83.9-100)	100	(78.2-100)
4	100	(83.9-100)	100	(78.2-100)
5	100	(83.9-100)	100	(78.2-100)
6	100	(83.9-100)	100	(80.5-100)
7	100	(83.9-100)	100	(80.5-100)
8	100	(83.9-100)	100	(80.5-100)
9	100	(83.9-100)	100	(80.5-100)

Tab. 4: Valori di accuratezza ottenuti nell'identificazione delle modificazioni indotte nella prostata dal trattamento con ormoni steroidei maschili

PROSTATA				
Lab.	Sensibilità	IC95%	Specificità	IC95%
1	100	(82.4-100)	100	(80.5-100)
2	100	(82.4-100)	100	(80.5-100)
3	100	(82.4-100)	100	(80.5-100)
4	100	(82.4-100)	100	(80.5-100)
5	100	(82.4-100)	100	(80.5-100)
6	100	(82.4-100)	100	(80.5-100)
7	100	(82.4-100)	100	(80.5-100)
8	94.7	(74-99.9)	100	(63.9-98.5)
9	100	(82.4-100)	100	(80.5-100)

Tab. 5: Valori di accuratezza ottenuti nell'identificazione delle modificazioni indotte nel timo dal trattamento con corticosteroidi

TIMO				
Lab.	Sensibilità	IC95%	Specificità	IC95%
1	88.2	(63.6-98.5)	78.9	(54.4-93.9)
2	100	(80.5-100)	89.5	(66.9-98.7)
3	70.6	(44-89.7)	89.5	(66.9-98.7)
4	70.6	(44-89.7)	73.3	(48.8-90.9)
5	88.2	(63.6-98.5)	84.2	(60.4-96.6)
6	70.6	(44-89.7)	89.5	(66.9-98.7)
7	70.6	(44-89.7)	89.5	(66.9-98.7)
8	94.1	(71.3-99.9)	84.2	(60.4-96.6)
9	82.4	(56.6-96.2)	89.5	(66.9-98.7)

CONCLUSIONI E DISCUSSIONE

I dati ottenuti mostrano livelli di riproducibilità decisamente alti. Ciò nondimeno l'accuratezza diagnostica del test istologico si dimostra complessivamente buona, soprattutto per la valutazione degli steroidi sessuali maschili. In sintesi i risultati dimostrano che il test istologico sta assumendo a tutti gli effetti le caratteristiche di performance indispensabili a tutti i test utilizzati routinariamente in sanità animale e sicurezza alimentare, superando peraltro i limiti di sensibilità analitica dei metodi chimici ad ora riconosciuti come soli metodi ufficiali.

BIBLIOGRAFIA

- Altman D.G.. (1st ed.) 1991. Practical statistics for medical research. Chapman & Hall, London.
- Fleiss J.L., B. Levin., M. Cho Paik. (3rd ed.) 2003. Statistical methods for rates and proportions. John Wiley & Sons, New York.

VALUTAZIONE DELL'ANTIGENE RICOMBINANTE E2 DEL VIRUS DELLA DIARREA VIRALE BOVINA (BVDV) IN UN SAGGIO SIEROLOGICO ELISA

Pezzoni G., Stercoli L., Cordioli P., Brocchi E.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia

Key words: BVDV, glicoproteina E2, ELISA

SUMMARY

Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) belongs to Pestivirus group, *Flaviviridae* family, composed of positive single strand RNA viruses. Currently serological assays for Pestiviruses are based on evaluation of antibodies against the non structural protein 3 (NS3). The E2 is a BVDV specific envelope glycoprotein that induces virus neutralizing antibodies.

Purpose of this study was the evaluation of the baculovirus expressed E2 glycoprotein for the serological diagnosis of bovine viral diarrhea virus.

INTRODUZIONE

Il virus della Diarrea Virale Bovina (BVDV) appartiene al genere *Pestivirus*, famiglia *Flaviviridae*, composta da virus a RNA a singolo filamento positivo. La glicoproteina dell'envelope E2 e la proteina non strutturale NS3 sono tra le proteine maggiormente immunogene di BVDV. Contrariamente alla NS3, che è comune a tutti i *Pestivirus*, la E2 è specifica rispetto al virus di provenienza e induce anticorpi neutralizzanti l'infettività virale. Una NS3 ricombinante, prodotta nel nostro laboratorio con il sistema Baculovirus, è attualmente utilizzata con successo come sorgente di antigene in saggi sierologici di screening per Pestivirus (1,2). Obiettivo del presente lavoro è la valutazione dell'antigene ricombinante E2 di BVDV da utilizzare in saggi ELISA in associazione al test di screening basato sulla NS3.

Al fine di ottenere un prodotto ricombinante con caratteristiche antigeniche sovrapponibili a quelle della proteina virale nativa ed essendo E2 una glicoproteina, è stato scelto il sistema di espressione Baculovirus in grado di effettuare le modificazioni post-traduzionali necessarie. L'antigene ricombinante ottenuto è stato valutato in ELISA trapping parallelamente all'antigene NS3.

MATERIALI E METODI

Clonaggio e produzione dell'antigene ricombinante E2-Sec :

La E2 è una proteina trans-membrana di tipo I con una porzione extracellulare N-terminale fortemente immunogena. La sequenza genica di E2 corrispondente al dominio extracellulare, derivata dal ceppo di riferimento NADL, è stata amplificata e clonata nel vettore di espressione pFastBac/HBM-TOPO, dove la presenza della sequenza HBM (HoneyBee Melittin) permette la compartimentazione della proteina nello spazio extracellulare e la realizzazione delle modificazioni post-traduzionali. Il plasmide ottenuto dopo clonaggio è stato denominato: pFastBac/HBM/E2-Sec (Fig.1)

Il baculovirus ricombinante (Bac-E2-Sec), ottenuto con il sistema Bac-to-Bac (Invitrogen), è stato amplificato e utilizzato per l'espressione dell'antigene E2-Sec in cellule Sf9 (*Spodoptera frugiperda* 9).

Anticorpi Monoclonali (AcM): è stato utilizzato un pannello di quattro (6G5, 3H1, 3G9 e 3B4) AcM anti-E2 prodotti verso un isolato di campo di BVDV e caratterizzati per la loro reattività verso vari ceppi virali di BVDV (3). Di questi, gli AcM 6G5 e 3H1 sono reattivi verso l'80% dei ceppi di BVDV, mentre i restanti due sono reattivi solo con il 15% e l'8% rispettivamente dei ceppi testati (3).

Immunofluorescenza: cellule Sf9 infettate con Bac-E2-Sec, fissate

con acetone 100%, sono state incubate con ciascun anticorpo monoclonale e successivamente con anti-immunoglobuline di topo coniugate con FITC.

ELISA trapping: ciascun AcM è stato adsorbito in concentrazione saturante (10mg/ml) su piastre ELISA; successivamente è stato incubato il lisato od il terreno di crescita di cellule Sf9 infettate con Bac-E2-Sec, seguito da sieri positivi e negativi per BVDV alla diluizione 1/50, e da anti-IgG bovine coniugate con perossidasi in successione. Cicli di lavaggio erano eseguiti tra ogni step e la reazione veniva infine sviluppata con OPD. I risultati sono stati espressi come Percentuale di Positività (PP) rispetto ad un siero di controllo positivo.

L'ELISA trapping basata sull'antigene NS3 è stata descritta precedentemente (2).

Sieri:

- 34 sieri bovini di campo suddivisi in positivi e negativi in base alla siero neutralizzazione;
- 646 sieri bovini di campo saggiati in parallelo in ELISA E2-Sec e ELISA NS3.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Una valutazione preliminare dell'espressione della E2-Sec è stata condotta in immunofluorescenza; i due AcM 6G5 e 3H1, diretti verso epitopi conservati e reattivi verso il ceppo di BVDV (NADL) utilizzato per la produzione dell'antigene ricombinante, hanno riconosciuto anche la E2-Sec espressa in cellule Sf9. Le rese produttive della proteina nonché la cinetica di espressione sono state valutate in ELISA trapping; in particolare data la tipologia di costruito sono stati testati sia i lisati di Sf9 infettate con baculovirus ricombinante sia i medium raccolti a vari tempi post-infezione. L'antigene ricombinante è risultato presente sia nel lisato cellulare sia nel medium di coltura, indicando che la proteina viene secreta e correttamente processata, con una massima espressione raggiunta tra 48h e 72h post infezione (Fig.2).

In uno studio pilota di fattibilità di un test sierologico basato sulla E2-Sec ricombinante, entrambi gli AcM sono stati inizialmente valutati come anticorpi di cattura in ELISA trapping, utilizzando come fonte di antigene il medium di infezione di Bac-E2-Sec: 34 sieri bovini di campo già classificati come positivi e negativi in sieroneutralizzazione hanno mostrato un'analogo profilo. Entrambi gli AcM catturano efficientemente l'antigene esponendolo al riconoscimento di sieri positivi; questo risultato dimostra che la porzione extracellulare della E2 è immunogena e l'antigene ricombinante si conforma correttamente esponendo epitopi antigenicamente reattivi.

L'anticorpo 3H1 è stato quindi scelto per valutare 646 sieri bovini di campo confrontandone la reattività verso la E2-Sec e la NS3 in ELISA trapping. I due test hanno mostrato una concordanza del 97% (629/646) (Tab.1).

Quindici sieri, risultati positivi in ELISA E2-Sec e negativi in ELISA NS3, sono stati confermati come positivi in siero neutralizzazione. La positività di alcuni sieri solo nella ELISA E2-Sec potrebbe dipendere in parte da una diversa cinetica della risposta immunitaria verso la proteina strutturale E2 e non-strutturale NS3 del virus, ma anche dallo stato vaccinale dei bovini, dal momento

che vaccini basati su virus inattivati o attenuati non inducono anticorpi anti-NS2-3 se non dopo ripetute vaccinazioni. I tre sieri reattivi solo verso la NS3 presentano nel test ELISA valori borderline.

La Fig.3 mostra la distribuzione dei valori quantitativi osservati nei due test ELISA per i 91 sieri positivi; i valori quantitativi sono stati elaborati come percentuale di positività (PP) rispetto ad un medesimo siero di riferimento fortemente positivo. In entrambi i test i sieri si distribuiscono in un ampio range di valori PP, evidenziando la possibilità di attribuire un significato quantitativo all'output del saggio e differenziare i campioni rispetto alla concentrazione dei rispettivi anticorpi; tuttavia, la correlazione tra i valori PP osservati con i due test ELISA per gli stessi campioni è risultata scarsa (dati non mostrati), suggerendo che la risposta umorale verso i due antigeni target è diversa.

CONCLUSIONE

La proteina ricombinante è stata espressa con successo: viene riconosciuta da AcM specifici verso la E2 di BVDV e coerentemente con la tipologia di costruito la proteina viene secreta nel medium di crescita delle cellule infette dal baculovirus ricombinante. La valutazione in ELISA trapping di sieri positivi e negativi indica che la E2-Sec è un antigene idoneo ad essere usato in un saggio diagnostico per la valutazione di anticorpi anti proteine strutturali di BVDV.

I risultati promettenti inducono a completare il processo di validazione del nuovo test ELISA-E2 prototipo, poiché la disponibilità di questo saggio permetterebbe sia di incrementare le conoscenze sul profilo immunitario degli animali infetti sia di disporre di uno strumento diagnostico addizionale.

Fig. 1: Clonaggio della porzione extracellulare di E2 (EC) nel vettore di espressione plasmidico per baculovirus contenente la sequenza della Honey Bee Mellitina (HBM), per permettere la compartimentazione extracellulare del prodotto ricombinante.

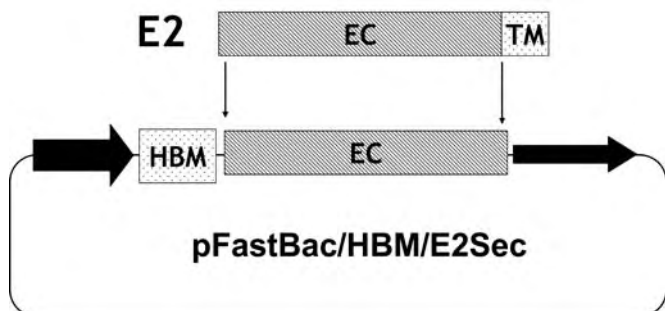


Figura 2: Time course dell'espressione della E2-Sec valutata in ELISA trapping con siero BVDV positivo ed immunocatturata con gli anticorpi monoclonali 6G5 e 3H1

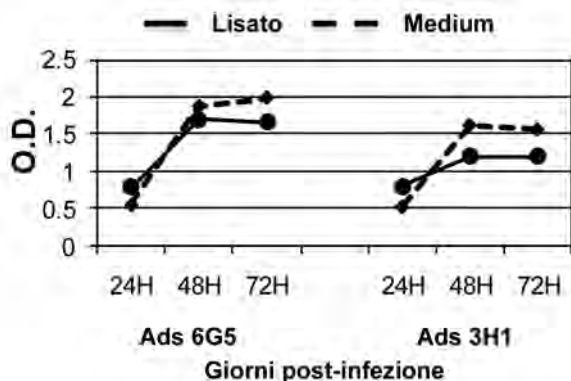
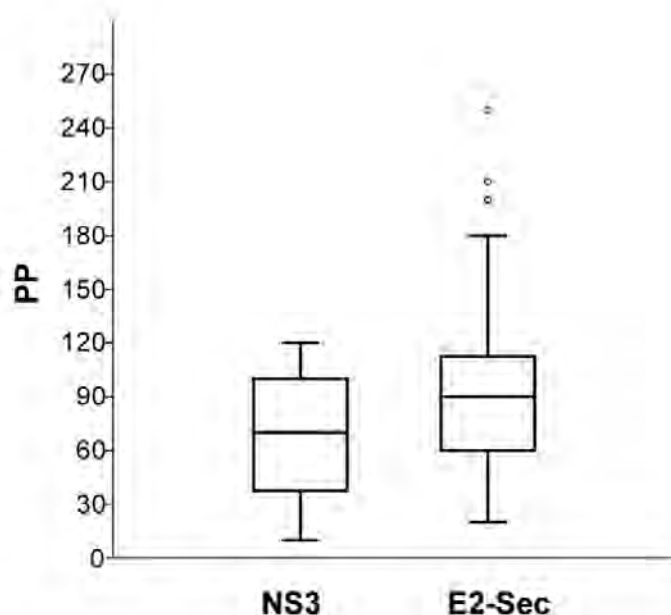


Tabella 1. Valutazione di 646 sieri bovini di campo testati in parallelo in ELISA trapping con l'antigene NS3 e con l'antigene E2-Sec

		ELISA NS3		TOT
		+	-	
ELISA E2	+	91	15	106
	-	3	537	540
	TOT	94	552	646

Figura 3: Box plot di distribuzione delle percentuali di positività (PP) dei 91 sieri di campo reattivi verso NS3 e E2-Sec



BIBLIOGRAFIA

1. Pezzoni G., Brocchi E., Produzione della proteina NS3 di BVDV (Bovine Viral Diarrhea Virus) in baculovirus con caratteristiche conformazionali ed antigeniche analoghe alla proteina nativa. X Congresso Nazionale Società Italiana Diagnostica di Laboratorio Veterinaria (SIDiLV) : 22-24 Ottobre 2008.
2. Pezzoni G., Brocchi E., Utilizzo dell'antigene ricombinante NS3, espresso tramite Baculovirus, nei test sierologici per anticorpi anti-pestivirus. X Congresso Nazionale Società Italiana Diagnostica di Laboratorio Veterinaria (SIDiLV) : 22-24 Ottobre 2008.
3. Brocchi, E., et al. Development of a panel of anti-Pestivirus monoclonal antibodies useful for virus identification and antibody assessment. Proceeding of the second symposium on Pestiviruses. 1-3 October 1992.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia la Sig. D. Bresciani per la preziosa ed affidabile assistenza tecnica. Il lavoro è parzialmente supportato dal Ministero della Salute (ricerca corrente IZSLER PRC2008/011).

LE TECNICHE ALTERNATIVE PER LA RIMOZIONE DEL MATERIALE SPECIFICO A RISCHIO RIDUCONO IL RISCHIO BSE PER L'UOMO

Pitardi D., Meloni D., Maurella C., Di Vietro D., Nocilla L., Maldera O., Piscopo A.¹, Pavoletti E.², Negro M.³, Caramelli M., Bozzetta E.

CEA, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; ¹ Azienda Sanitaria Locale Agrigento; ² Azienda Sanitaria Locale Vercelli; ³ Azienda Sanitaria Locale Mondovì (Cuneo).

Key words: Materiale Specifico a Rischio, Sistema Nervoso Centrale, Ridascreen Risk Material 10/5

ABSTRACT

SRM contamination of carcasses can occur during some steps of slaughter practice (1, 2, 3). To investigate CNS contamination, some assays are available. In a previous study, the Authors plotted a ROC curve to identify the finest cutoff of the test Ridascreen® Risk Material 10/5. By this approach, accuracy and reliability of the test were optimized (4). The aim of this study, was to compare the SRM contamination of carcasses applying three different SRM removal techniques.

INTRODUZIONE

La correlazione emersa fra BSE e nuova variante del morbo di Creutzfeldt Jakob (vCJD) ha evidenziato il carattere zoonotico della malattia e conseguentemente il rischio rappresentato dal consumo di tessuti bovini infetti per l'uomo.

Negli animali colpiti da BSE, il prione si accumula maggiormente in alcuni organi definiti Materiale Specifico a Rischio (MSR), tra i quali il più importante, per concentrazione del patogeno, è il Sistema Nervoso Centrale, ossia encefalo e midollo spinale.

L'esclusione del MSR dal consumo umano, prevista sin dal 2001 (5), viene pertanto considerata la misura più efficace ad oggi per ridurre l'esposizione del consumatore al rischio BSE, soprattutto in relazione al progressivo rilassamento delle misure applicate in questo contesto.

Recenti studi hanno evidenziato come le metodiche utilizzate in sede di macellazione per l'allontanamento del MSR determinino importanti contaminazioni da SNC a carico delle carni di spollo delle teste e delle masse muscolari adiacenti alla colonna vertebrale (1, 2, 3). Inoltre, le metodiche tradizionali di macellazione mediante divisione della carcassa in mezzene con sega elettrica, prima dell'allontanamento del midollo spinale, sembra possano determinare una aerosolizzazione del MSR con conseguente contaminazione dell'ambiente di macellazione e cross-contaminazione delle carcasse (6, 7)

L'obiettivo del presente studio è stato quello di valutare la contaminazione delle carcasse sottoposte ai metodi tradizionali di allontanamento del MSR, e la successiva comparazione con due tecniche alternative, che permettono l'eliminazione del MSR prima della divisione della carcassa. Una prevede l'aspirazione del midollo attraverso una sonda inserita nel canale midollare a livello dell'atlante (8), l'altra consiste in un'idropulsione del midollo spinale mediante l'applicazione di un getto d'acqua nel canale midollare.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Il campionamento è stato effettuato mediante tampone strofinato su un'area di 10X10cm a livello dei muscoli paravertebrali nella regione cervicale. Il tampone quindi è stato stemperato in una provetta contenente 1 ml di soluzione di diluizione.

Il campionamento è stato condotto successivamente alla divisione della carcassa in mezzene, per ogni animale è stato raccolto un solo campione.

Test Ridascreen Risk Material 10/5

Il test è basato su una metodica ELISA con rilevazione immunoenzimatica della Proteina Acida Glifibrillare (GFAP) presente ad alte concentrazioni a livello del SNC. Il valore di cut-off fra campione positivo e negativo è stata identificata alla concentrazione di SNC pari a 0,049% in base ad un precedente studio. L'espressione dei risultati è facilitata dall'utilizzo del software RIDA®SOFT Win (R-Biopharm) che permette l'elaborazione automatica dei dati e l'espressione dei risultati attraverso retta di regressione.

Prevalenza basale

Per calcolare la prevalenza basale di contaminazione da SNC delle mezzene ottenute secondo metodi tradizionali ed il numero di campioni da prelevare per il successivo studio comparativo, sono state campionate 216 mezzene in un macello di grosse dimensioni (> 4000 capi/anno) e 196 in uno di medie dimensioni (≤ 4000 capi/anno).

Studio comparativo

Al fine di valutare la metodica più efficace per l'eliminazione del MSR, sono state campionate 50 mezzene per ogni tecnica. Il campionamento per tutte e tre le metodiche (tradizionale, per idropulsione e per aspirazione) Per questioni organizzative, le metodiche alternative sono state applicate agli ultimi 5 bovini di ogni giornata di macellazione fino al raggiungimento del numero stabilito.

Studio esplorativo

E' stato effettuato un campionamento esplorativo al fine di valutare l'eventuale ruolo della sega circolare nella cross contaminazione delle masse muscolari adiacenti alla colonna vertebrale con SNC derivante dalle macellazioni "tradizionali" precedenti all'applicazione dell'idropulsione ed al relativo campionamento, nella stessa giornata di lavoro. A seguito dell'applicazione di tale tecnica si è quindi provveduto a campionare le prime due carcasse della giornata di macellazione e le ultime due per una settimana.

RISULTATI

Stabilita una prevalenza attesa del 10%, un intervallo di confidenza del 95% ed un errore accettabile pari al 4%, la dimensione del campione è stata stratificata per due diversi tipi di macello, di medie e grandi dimensioni. I dati raccolti sono stati inseriti in un database ad hoc e sono stati analizzati mediante software Stata 10.1.

Al fine di calcolare la prevalenza basale di contaminazione da SNC delle mezzene ottenute secondo metodi tradizionali ed il numero di campioni da prelevare per lo studio comparativo, sono state campionate 216 mezzene in un macello di grosse dimensioni (> 4000 capi/anno) e 196 in uno di medie (≤ 4000 capi/anno).

La prevalenza di contaminazione ottenuta si è attestata attorno al 60,2% e per lo studio comparativo si è deciso di campionare 50 carcasse per ognuna delle tre metodiche.

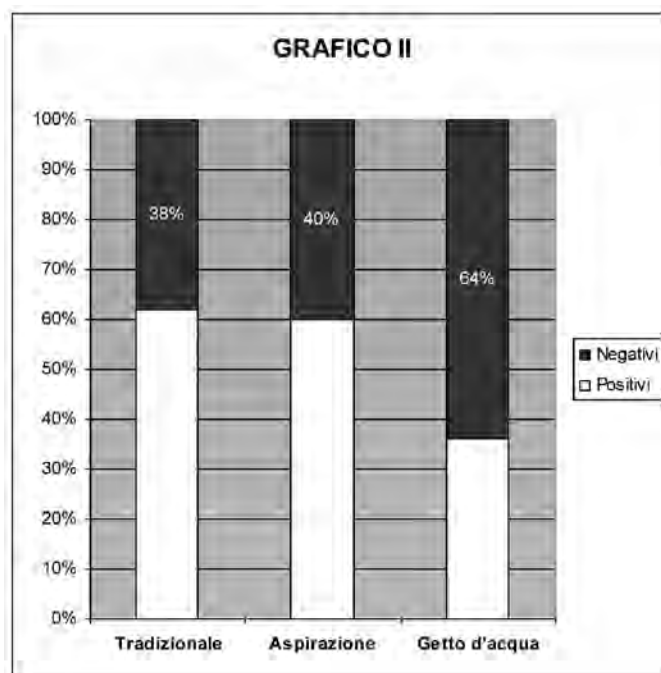
Il Grafico I mostra la percentuale di contaminazione raggruppata secondo metodo di eliminazione del MSR.

In Tabella I sono riportati i risultati dell'analisi statistica effettuata per valutare la differenza fra i tre metodi di rimozione del midollo spinale. Le differenze di contaminazione fra i tre metodi sono significative ($p=0,005$), la tecnica mediante getto d'acqua è risultata essere quella che garantisce il livello più basso di contaminazione. Nel Grafico II sono riportate le percentuali di contaminazione rilevate per ognuna delle tre metodiche.

Per quanto riguarda la valutazione della correlazione fra stato di pulizia della sega circolare e contaminazione da MSR, l'analisi condotta con il test per dati non parametrici della somma dei ranghi di Wilcoxon mostra una differenza significativa tra i campioni eseguiti con la sega pulita rispetto a quelli con sega sporca ($p=0.015$).

TABELLA I		
METODO	N° CAMPIONI	RANK SUM
Tradizionale	50	4407.5
Aspirazione	50	3912
Getto d'acqua	50	3005.5

$\chi^2=10.712$ con 2 d.f. $P=0.005$



DISCUSSIONE/CONCLUSIONI

Le metodiche alternative garantiscono una riduzione della contaminazione da MSR. La tecnica mediante aspirazione necessita di ulteriore implementazione in quanto non permette la completa eliminazione del midollo spinale. La metodica per idropulsione garantisce una completa e rapida eliminazione del MSR; la contaminazione residua dei campioni ottenuti mediante tale metodica sembra effettivamente imputabile ad una cross contaminazione operata dalla sega circolare precedentemente utilizzata nell'ambito della macellazione tradizionale, come peraltro evidenziato da altri autori (2, 7). L'applicazione dell'idropulsione del midollo spinale prima della suddivisione della carcassa in mezzane, qualora applicata in routine garantirebbe pertanto una sensibile riduzione dell'esposizione del consumatore al rischio BSE.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il Sig. Graziano Roncaglia della LGR equipment per la partecipazione durante la fase di campionamento successivo all'aspirazione del midollo spinale.

La ricerca è stata finanziata dal Ministero della Salute nell'ambito della ricerca corrente 2008 (IZSPLV 03/08 RC).

BIBLIOGRAFIA

- Bowling M.B., Belk K.E., Nightingale K.K., Goodridge L.D., Scanga J.A., Sofos J.N., Tatum J.D., Smith G.C., (2007). Central nervous system tissue in meat products: an evaluation of risk, prevention strategies, and testing procedures. *Adv Food Nutr Res.*;53:39-64.
- Helps C. R., Hindell P., Hillman T. J., Fisher A. V., Anil H., Knight A. C., Whyte R. T., O'Niell D. H., Knowles T. G., Harbour D. A., (2002). Contamination of beef carcasses by spinal cord tissue during splitting. *Food Control*;13:417-423.
- Prendergast D. M., Sheridan J. J., Daly D. J., McDowell D. A., Blair I. S., (2003). Dissemination of central nervous system tissue from the brain and spinal cord of cattle after captive bolt stunning and carcass splitting. *Meat Science*; 65:1201-1209.
- Bozzetta E., Nappi R., Ru G., Maurella C., Negro M., Caramelli M., (2006). Evaluation of an Enzyme Immunoassay for the Detection of Central Nervous System Tissue Contamination at the Slaughterhouse; *Journal of Food Protection*; 69:2289-2292.
- REGOLAMENTO (CE) N. 999/2001 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 22 maggio 2001. Recante disposizioni per la prevenzione, il controllo e l'eradicazione di alcune encefalopatie spongiformi trasmissibili; GU; L 147/1 del 31/05/2001
- Ramantanis, S. B. 2006. Alternative cattle slaughtering technologies and/or measures reducing the dissemination of central nervous system tissue during head handling, harvesting of cheek meat and tongue and carcass splitting - a review. *Veterinarski Arhiv* .76 (1): 19-36.
- Troeger, K. 2004. Overview of current and alternative slaughter practices. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environmen*. 8 (4): 275-281.
- Piscopo, A. 2001. Tecnica di rimozione del midollo spinale. *Il Progresso Veterinario*. 7: 354-357.

STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILLINO RESISTENTE (MRSA) NEL CAVALLO: SEGNALAZIONE DI UN CASO PRESSO L'OSPEDALE VETERINARIO DI LODI

Pollera C.¹, Ferrucci F.², Zucca E.², Pozzi F.³, Cremonesi P.⁴, Franco A.⁵, Luini M.³

¹Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Milano; ²Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Scienze Cliniche, Milano; ³IZSLER – Sezione di Lodi; ⁴Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria – CNR, Lodi, ⁵IZSLT – CRN per l'Antibioticoresistenza

Key words: *Staphylococcus aureus*, meticillinoresistenza, cavallo

SUMMARY

The recognition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals has raised the concern over their role as potential reservoirs or vectors for human MRSA infection. The aim of our study was to investigate the presence of MRSA in *S. aureus* strains isolated from horses admitted to the Veterinary Hospital of Lodi. A total of 31 animals were tested and 3 were found positive for *S. aureus*. One sample was positive for MRSA. Interestingly, the same horse carried MRSA and MSSA in nostrils. The MRSA isolate was identified as clonal complex 398.

INTRODUZIONE

Gli stafilococchi meticillino-resistenti sono da anni oggetto di particolare interesse nel campo della medicina umana. I ceppi di MRSA devono la loro resistenza alla meticillina, molecola di elezione per la terapia delle infezioni stafilococciche nell'uomo, alla presenza del gene *mecA*, che codifica per una variante della *penicillin binding protein* (PBP), indicata come PBP-2a. Gli antibiotici β -lattamici normalmente agiscono legando le PBP della parete, inibendo la sintesi del peptidoglicano e causando così la morte delle cellule batteriche. La variante PBP-2a è insensibile all'azione dei β -lattamici, pertanto può continuare la sua attività di sintesi anche in loro presenza, rendendo la loro azione del tutto inefficace. Il gene *mecA* è veicolato da un elemento genetico mobile denominato *SCCmec* (*Staphylococcal Chromosome Cassette mec*), presente in diversi tipi. In generale, le infezioni umane sostenute da MRSA possono essere classificate in HA-MRSA (*Healthcare-Acquired*), o infezioni nosocomiali, CA-MRSA (*Community Acquired*), infezioni osservate in soggetti non ospedalizzati. Con il termine *Livestock-associated* MRSA, (LA-MRSA) si indicano quei cloni di MRSA circolanti nelle specie animali zootecniche (7). Negli ultimi anni vari cloni di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistenti sono stati isolati da numerose specie animali. La presenza di MRSA negli animali rappresenta un potenziale rischio per l'uomo, e a loro volta gli animali possono essere colonizzati da ceppi umani. Numerosi studi hanno dimostrato la presenza di ceppi di MRSA nel cavallo, in particolare del ceppo ST398, il ceppo più rappresentativo dei LA-MRSA; nelle zone dove la prevalenza di tale ceppo negli animali da produzione alimentare è alta, le persone in contatto con questi ultimi, in particolare allevatori e veterinari, sono a maggior rischio di colonizzazione e di infezione rispetto alla popolazione generale con emergenza di casi clinici (1,3,7,9,10,11,12). Il presente lavoro descrive l'isolamento di *Staphylococcus aureus* e la genotipizzazione di un ceppo di MRSA da tamponi nasali di un cavallo.

MATERIALI E METODI

Campioni - Nel periodo marzo-luglio 2011 sono stati raccolti campioni da 31 cavalli, dei quali 26 ricoverati presso l'Ospedale Grandi Animali di Lodi, la maggior parte per calo del rendimento atletico, e 5 provenienti dalla stessa scuderia di uno dei soggetti ricoverati. Sono stati eseguiti tamponi nasali e perineali. Tamponi

sterili in cotone sono stati inseriti all'interno della narice e fatti ruotare a contatto con la mucosa nasale. Per i tamponi rettali sono state utilizzate spugnette di 3,5x3,5 cm immerse in 10 ml di acqua peptonata (APT) addizionata con il 7% di NaCl; il prelievo è stato effettuato strofinando la spugna in corrispondenza dell'area perineale

su una superficie di circa 10 cm². I tamponi sono stati mantenuti a 4°C fino al momento del processamento (eseguito entro le 24 ore).

Esami batteriologici - I tamponi nasali sono stati seminati su agar sangue e Baird-Parker + Rabbit Plasma Fibrinogen agar (BP-RPF). Nel caso dei tamponi perineali un tampone sterile imbevibile dell'APT + 7% di NaCl delle spugnette è stato seminato su agar sangue e BP-RPF. Una volta effettuata la semina, i tamponi nasali sono stati posti in 10 ml di APT + 7% di NaCl. 20 ml della stessa soluzione sono stati aggiunti alle buste contenenti i tamponi perineali.

Le piastre e i terreni di arricchimento così ottenuti sono stati incubati per 24 ore a 37°C in condizioni di aerobiosi. Dopo 24 ore si è provveduto alla semina degli arricchimenti con tamponi sterili su agar sangue e su BP-RPF. Sono quindi state scelte 4 o 5 colonie riferibili a *S. aureus* (alone di emolisi su agar sangue e caratteristico alone di opacamento per coagulazione del plasma su BP-RPF) per la conferma mediante test della coagulazione in provetta e fermentazione del mannitolo su Mannitol Salt Agar (MSA).

Meticillino-resistenza - Per ciascun campione, fino a 5 colonie riferibili a *S. aureus* sono state sottoposte a *screening* per la meticillino-resistenza mediante test di sensibilità all'oxacillina secondo il metodo Kirby Bauer utilizzando dischetti da 1 µg. Per aloni di inibizione > di 12 mm i ceppi sono stati considerati sensibili, per aloni compresi tra 12 e 10 mm intermedi, e ≤ 10 resistenti. Dai ceppi risultati resistenti o intermedi all'oxacillina è stato estratto il DNA utilizzando il kit "Dneasy Blood and Tissue" (Qiagen) e successivamente è stato amplificato mediante una reazione di multiplex PCR per l'identificazione simultanea dei geni *nuc* e *mecA*, utilizzando *primers* riportati in letteratura (2, 6) e l'utilizzo di DNA polimerasi HotStarTaq (Qiagen). Il ciclo di amplificazione prevede una denaturazione iniziale a 95°C per 15 minuti, seguita da 30 cicli di 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 56°C e 1 minuto a 72°C e un'estensione finale a 72°C per 7 minuti.

Caratterizzazione molecolare - I ceppi di *S. aureus* isolati sono stati caratterizzati utilizzando la tecnica RS-PCR descritta da Fournier *et al.* (5), basata sull'amplificazione dello spazio intergenico 16S-23S rRNA. L'isolato MRSA è stato inoltre genotipizzato per MLST (Multi Locus Sequence Typing) secondo quanto riportato in letteratura (4).

RISULTATI

Esami batteriologici - Sul totale di 31 animali testati 3 (soggetti ricoverati) sono risultati positivi per *S. aureus* (3,5%). I campioni positivi si riferivano ai soli tamponi nasali, e in un caso l'isolamento è stato ottenuto dalla semina del terreno di arricchimento.

Meticillino-resistenza – Due dei 3 campioni risultati positivi per *S. aureus* sono risultati sensibili all'oxacillina. Il terzo campione ha mostrato un comportamento peculiare: il test di sensibilità all'oxacillina prima e la multiplex PCR eseguita sul DNA estratto poi hanno rivelato infatti la presenza contemporanea nello stesso soggetto, a livello di cavità nasali, di due ceppi di *S. aureus*, un MRSA e un MSSA. Entrambi i ceppi erano presenti in coltura pura sui terreni di isolamento, contrariamente a quanto osservato negli altri due campioni di tamponi nasali risultati positivi per *S. aureus*.

Caratterizzazione molecolare – L'analisi MLST ha consentito di classificare il ceppo MRSA come complesso clonale 398 (CC398). L'analisi dello spazio intergenico 16S-23S rRNA dei due ceppi di *S. aureus*, MRSA e MSSA, presenti contemporaneamente in uno stesso soggetto, ha consentito di ottenere due profili elettroforetici completamente differenti. Il ceppo MRSA presentava 10 picchi di ampiezza compresa tra i 417 e 655 bp mentre il ceppo MSSA 8 picchi di ampiezza compresa tra 402 e 664 bp.

Caso clinico - Il cavallo MRSA positivo era un Hannover femmina di 20 anni, ricoverato presso la Clinica del cavallo dell'Ospedale Veterinario di Lodi per problemi respiratori; l'esame batteriologico effettuato sull'aspirato delle tasche gutturali e sul fluido pleurico è risultato negativo, mentre quello effettuato sull'aspirato trans-tracheale ha rilevato la presenza di *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. Per il successivo aggravarsi della sintomatologia, il soggetto è stato sottoposto ad eutanasia. Il referto autoptico riferisce di imponenti lesioni pleuro-polmonari, e in particolare di una grave e diffusa polmonite fibrino-purulenta con presenza di focolai di necrosi e caverne broncoectasiche con essudato di color rosso bruno, presente in abbondanza anche nelle vie aeree più prossimali dove la mucosa si presentava iperemica e con zone di erosione. Gli esami batteriologici effettuati dal polmone sono risultati negativi per *S. aureus*.

Il campionamento effettuato su 5 cavalli provenienti dalla stessa scuderia del soggetto risultato positivo ha avuto esito negativo.

DISCUSSIONE

Con questo lavoro abbiamo dimostrato la presenza di un ceppo di *S. aureus* meticillino-resistente in un cavallo ricoverato presso l'Ospedale Veterinario di Lodi. Studi similari effettuati da diversi Autori (1,9,11) riportano percentuali di positività per MRSA nei cavalli comprese tra il 1,3% (in soggetti sani) e il 16% (in soggetti ricoverati presso strutture ospedaliere veterinarie per molteplici cause). I nostri risultati al momento non ci permettono, data l'esiguità del campione, di avere un quadro esauriente sull'effettiva presenza del patogeno in oggetto sul territorio, ma è comunque interessante il dato ottenuto della concomitante presenza, in coltura pura, di due ceppi MRSA e MSSA nello stesso soggetto, limitatamente alle prime vie respiratorie. L'utilizzo di RS-PCR, ha mostrato la compresenza di due differenti ceppi di *S. aureus* nella cavità nasale di un singolo soggetto. I profili che si generano durante l'analisi consentono solo di affermare la presenza di isolati diversi. I cavalli MRSA-positivi non presentano necessariamente infezioni clinicamente manifeste, ma la colonizzazione rappresenta un significativo fattore di rischio per lo sviluppo di infezioni, in particolar modo in caso di ospedalizzazione. Il nostro soggetto è purtroppo stato sottoposto ad eutanasia prima che fosse possibile condurre in modo esaustivo accertamenti di laboratorio volti ad approfondire le cause della malattia e tutti gli agenti eziologici eventualmente coinvolti; abbiamo potuto solo rilevare colonizzazione a carico delle prime vie respiratorie. Il rilevamento del complesso clonale 398 risulta in linea con studi similari condotti da altri Autori (9,11), che ne descrivono il sempre più frequente isolamento nella popolazione zootecnica e nel cavallo e ne sottolineano, a causa della sua nota trasmissione

interspecie, la sua rilevanza zoonosica. Al momento l'indagine sulla presenza di ceppi di MRSA nei cavalli ricoverati presso l'Ospedale Grandi Animali di Lodi è ancora in corso, allo scopo di ampliare la casistica e di ottenere maggiori informazioni sulla circolazione di MRSA nei cavalli del territorio.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Axon J.E., Carrick J.B., Barton M.D., Collins N.M., Russell C.M., Kiehene J., Coombs G., 2011, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a population of horses in Australia, Australian Veterinary Journal, 89(6), 221-225.
- 2) Cremonesi P, Luzzana M, Brasca M, Morandi S, Iodi R, Vimercati C, Agnellini D, Caramenti G, Moroni P, Castiglioni B (2005). Development of a multiplex PCR assay for the identification of staphylococcus aureus enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. Molecular and Cellular Probes, 19:299-305.
- 3) De Martino L., Lucido M., Mallardo K., Facello B., Mallardo M., Iovane G., Pagnini U., Tufano M.A., Catalanotti P., 2010, Methicillin resistant staphylococci isolated from healthy horses and horse personnel in Italy, Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 22, 77-82.
- 4) Enright M.C., Day N.P., Davies C.E., Peacock S.J., Spratt B.G., 2000, Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*, Journal of Clinical Microbiology, 38, 1008-1015.
- 5) Fournier C, Kuhnert P, Frey J, Miserez R, Kirchhofer M, Kaufmann T, Steiner A, and Graber HU (2008): Bovine *Staphylococcus aureus*: association of virulence genes, genotypes and clinical outcome. Results in Veterinary Science, 85(3): 439-448.
- 6) McClure JA, Conly JM, Lau V, Elsayed S, Louie T, Hutchins W, Zhang K (2006). Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Panton-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from resistant staphylococci, Journal of Clinical Microbiology, 44:1141-1144.
- 7) Pan A., Battisti A., Zoncada A., Bernieri F., Boldini M., Franco A., Giorgi M., Iurescia M., Lorenzotti S., Martinotti M., Monaci M., Pantosti A., 2009. Community-acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 Infection, Italy. Emerging Infectious Diseases, 15: 845-847.
- 8) Pantosti A., Venditti M., 2010, What is MRSA? European Respiratory Journal, 2009, 34, 1190-1196.
- 9) Smith T.C., Pearson N., 2011, The emergence of *Staphylococcus aureus* ST398, Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 11(4), 2011.
- 10) Tokatelloff N., Manning S.T., Weese J.S., Campbell J., Rothemburger J., Stephen C., Bastura V., Gow S.P., Reid-Smith R., 2009, Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in horses in Saskatchewan, Alberta, and British Columbia, Canadian Veterinary Journal, 50, 1177-1180.
- 11) Van den Eede A., Martens A., Lipinska U., Struelens A., Deplano O., Denis F., Haesebrouck F., Gasthuys F., Hermans K., 2009, High occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in equine nasal samples, Veterinary Microbiology, 133, 138-144.
- 12) van Duijkeren E., Moleman M., van Oldruitenborgh-Oosterbaan M.M.S, Mulder J., Troelstra A., Fluit A.C., van Wamel W.J.B., Houwers D.J., de Neeling A.J., Wagenaar, J.A., 2010, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horse and horse personnel: an investigation of several outbreaks, Veterinary Microbiology, 141, 96-102.

Le ricerche sono state eseguite nell'ambito del Progetto di Ricerca Corrente Ministero della Salute PRC2008/08-IZSLER.

DIFFUSIONE DELLE VARIANTI DI PARVOVIRUS IN CANI DI ALCUNE PROVINCE DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA E IMPORTATI DALL'EST EUROPA

Prati P.¹, Manfredini A.¹, Vicari N.¹, Pongolini S.², Petasecca D.¹, Colmegna S.³, Fabbi M.¹

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "B. Ubertini"
¹Sezione Diagnostica di Pavia, ²Sezione Diagnostica di Parma, ³Sezione Diagnostica di Milano

Parole chiave: Parvovirus, genotipizzazione, cane

SUMMARY

Canine *Parvovirus* (CPV2) is the most important cause of morbidity and mortality in young dogs. Both antigenic and molecular analysis have shown that the original type 2 virus (CPV-2) evolved in three variants namely CPV-2a, 2b and 2c. The aim of this study was to characterize the CPV-2 circulating in dogs from some provinces of Lombardia and Emilia Romagna regions. Samples were collected from dead and symptomatic dogs from 2008 to 2011. Our data show that the CPV-2a is the prevalent subtype (52/58 samples) while 5 samples were typed as CPV-2b and only one was typed as CPV-2c.

INTRODUZIONE

Il *parvovirus* canino tipo 2 (CPV-2) è comparso alla fine degli anni settanta e si è diffuso rapidamente in tutto il mondo e la parvovirosi canina è attualmente considerata la più importante causa di mortalità nei cuccioli. L'elevata incidenza della gastroenterite da *parvovirus* è legata alla capacità del virus di mutare ed evolvere in nuove varianti più virulente e più resistenti. Dopo pochi anni dalla sua comparsa, il tipo 2 viene totalmente "sostituito" da 2 nuove varianti: CPV-2a e CPV-2b mentre nel 2000 viene segnalata per la prima volta in Italia la presenza della terza variante CPV-2c (1). La diffusione delle tre varianti è pressoché ubiquitaria anche se con qualche differenza nel grado di diffusione. In Italia (4), Belgio (4), Bulgaria (7), e in Grecia (8) prevale la variante 2a, in Cina la 2b (10), in Spagna (4) e in Argentina la variante 2c (2). In Inghilterra prevale di poco la 2b rispetto alla 2a (4). In Brasile fino al 2006 circolava solo la variante 2a, mentre ad oggi c'è una netta prevalenza di 2b (3). In USA la variante 2c è largamente diffusa mentre in Inghilterra è stata riportata un'unica segnalazione (4).

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato effettuato su 58 DNA ottenuti da contenuti intestinali di cani con sintomatologia clinica e lesioni anatomopatologiche riferibili a parvovirosi. Di questi, 37 appartenevano ad animali autoctoni di alcune province della Lombardia (Pavia, Mantova, Como e Sondrio) e dell'Emilia Romagna (Modena, Reggio Emilia, Bologna e Ravenna) e 21 a cani importati dall'Europa dell'Est. L'età dei soggetti variava tra i 2 e 5 mesi e l'esito della malattia è risultato sempre fatale. La diagnosi era stata confermata mediante PCR convenzionale che amplifica parte del gene codificante per la proteina capsidica VP2 del virus (9). Per la tipizzazione dei *parvovirus* sono state eseguite due MGB-real-time PCR specifiche per le varianti 2a, 2b e 2c che si basano su SNPs del gene VP2 che differenziano le tre varianti (5). Inoltre per escludere la presenza di virus di origine vaccinale i campioni sono stati sottoposti ad una terza MGB real-time PCR (6) in grado di discriminare tra virus vaccinale e virus selvaggio.

RISULTATI

Dei 58 DNA analizzati 52 sono stati identificati come CPV-2a, 5 come CPV-2b e solo 1 come CPV-2c (Tab.1). In tutti i campioni di cani importati dall'est Europa è stata identificata unicamente la variante 2a. Tutti i campioni risultati positivi per la variante CPV-2b erano di origine nazionale come l'unico campione risultato CPV-2c. La maggior parte dei campioni (55/58) sono risultati positivi al virus selvaggio. Solo in due campioni si è riscontrata la co-infezione da virus di origine vaccinale e da virus selvaggio, mentre un cucciolo è risultato positivo al solo virus di origine vaccinale.

Numero campioni	variante
52	2a
5	2b
1	2c

Tabella 1: varianti antigeniche di *parvovirus* canino presenti nei campioni testati

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati di questa tipizzazione molecolare mostrano la netta prevalenza del tipo 2a sia nei cani nazionali che negli animali importati. Decisamente meno frequenti sono risultati i CPV tipo 2b mentre in un solo caso è stata identificata la variante 2c. Riguardo alle 5 varianti 2b individuate i test molecolari utilizzati non sono in grado di distinguere tra il virus selvaggio e quello vaccinale. Tuttavia in tutti i 5 casi i soggetti avevano presentato sintomi e lesioni anatomo-patologiche caratteristiche della malattia ed inoltre dalla indagine anamnestica intrapresa per questi casi era emerso che nessun animale risultava aver ricevuto alcuna vaccinazione verso il *parvovirus* canino.

I dati ottenuti da questa indagine confermano quanto già osservato in altri studi (4) dai quali emerge la presenza in Italia di tutte e tre le varianti del *parvovirus* anche se il tipo 2a prevale sulle altre. Ad eccezione di tre animali, tutti gli altri sono stati infettati da virus selvaggio. In due cuccioli è stata rilevata una co-infezione da tipo a selvaggio e vaccinale; abbiamo potuto verificare che erano passati pochi giorni tra la vaccinazione e la comparsa dei sintomi della malattia per cui possiamo ragionevolmente ipotizzare che si possano essere infettati appena prima o contemporaneamente alla somministrazione del vaccino. Per l'unico animale che presentava solo il ceppo di origine vaccinale possiamo supporre che, trattandosi di un virus vivo attenuato, lo stesso possa aver scatenato la malattia in un soggetto probabilmente molto defedato, situazione questa che spesso si verifica nei cuccioli importati clandestinamente o che stazionano a lungo in negozi per animali dove i cuccioli si trovano spesso in condizione di stress e mantenuti in precarie condizioni igienico-sanitarie.

BIBLIOGRAFIA

1. Buonavoglia C, Martella V, Pratelli A, Tempesta M, Cavalli A, Buonavoglia D, Bozzo G, Elia G, Decaro N, Carmichael L., (2001). Evidence for evolution of canine *parvovirus* type 2 in Italy. J Gen Virol. 2001 Dec;82:3021-5.
2. Calderón MG, Romanutti C, D' Antuono A, Keller L, Mattion N, La Torre J. 2011. Evolution of canine parvovirus in Argentina between years 2003 and 2010: CPV2c has become the predominant variant affecting the domestic dog population. Virus Res.;157(1):106-10.
3. Castro TX, Costa EM, Leite JP, Labarthe NV, Cubel Garcia RC. 2011. Monitoring of canine *parvovirus* (CPV) strains detected in vaccinated puppies in Brazil. Res Vet Sci.;90(2):336-40.
4. Decaro N, Desario C, Billi M, Mari V, Elia G, Cavalli A, Martella V, Buonavoglia C. 2011. Western European epidemiological survey for *parvovirus* and *coronavirus* infections in dogs. Vet J.;187(2):195-9.
5. Decaro N, Elia G, Martella V, Campolo M, Desario C, Camero M, Cirone F, Lorusso E, Lucente MS, Narcisi D, Scalia P, Buonavoglia C. 2006a. Characterization of the canine *parvovirus* type 2 variants using minor groove binder probe technology. Journal of Virological Methods 133, 92–99.
6. Decaro N., Elia G., Desario C., Roperto S., Martella V., Campolo M., Lorusso A., Cavalli A., Buonavoglia C. 2006b. A minor groove binder probe real-time PCR assay for discrimination between type 2-based vaccines and field strains of canine parvovirus. Journal of Virological Methods 136, 65–70.
7. Filipov C, Decaro N, Desario C, Amorisco F, Sciarretta R, Buonavoglia C. 2011. Canine *parvovirus* epidemiology in Bulgaria. J Vet Diagn Invest.;23(1):152-4.
8. Ntafis V, Xylouri E, Kalli I, Desario C, Mari V, Decaro N, Buonavoglia C. 2010. Characterization of Canine *parvovirus* 2 variants circulating in Greece. J Vet Diagn Invest.;22(5):737-40.
9. Uwatoko K., Sunairi M., Nakajima M., et al. 1995. Rapid method utilizing the polymerase chain reaction for detection of canine *parvovirus* in feces of diarrheic dogs. Veterinary Microbiology, 43: 315-323
10. Zhang Q, Xu XM, Zhai GQ, Wang Z, Hou SH, Zhu HF. 2010. Molecular characterization of canine *parvovirus* strains circulating in China. African Journal Of Biotechnology, 9(29):4556-4560

LE MICOBATTERIOSI ATIPICHE IN FAUNA ITTICA SELVATICA: CONFRONTO IN TRE BIOTOPHI DULCIACQUICOLI DELL'ITALIA SETTENTRIONALE

Prearo M.¹, Righetti M.¹, Giorgi I.¹, Arsieni P.¹, Fioravanti M. L.², Zandoni R. G.², Pavoletti E.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino;

² Dipartimento Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum, Via Tolara di sopra, 50 – 40064 Ozzano Emilia (BO).

Key words: Micobatteriosi atipiche, Fauna ittica selvatica, Biotopi dulciacquicoli

INTRODUZIONE

Le Micobatteriosi atipiche sono malattie sistemiche, ad andamento cronico e diffusione cosmopolita che possono colpire sia specie ittiche dulciacquicole che marine (7). I casi, sempre più numerosi, riguardano soprattutto specie ornamentali (10) o da reddito (1, 2), in cui le condizioni ambientali favoriscono l'insorgenza di queste patologie.

Per quanto riguarda invece la fauna ittica selvatica, le segnalazioni sul territorio italiano sono scarse e frammentarie (4, 5, 8), soprattutto per mancanza di dati statisticamente significativi. Infatti è estremamente difficile poter analizzare quantitativi sufficienti di pesci provenienti da un medesimo ecosistema; inoltre, visto il carattere cronico della malattia, che spesso porta ad una sintomatologia evidente e alla comparsa di segni clinici conclamati solo verso l'exitus dell'episodio, e la sporadicità con cui si possono manifestare queste patologie in un ambiente non circoscritto come quello lacustre, fluviale o marino, appare quanto mai difficoltoso intraprendere uno studio di questo tipo.

La malattia è caratterizzata dalla comparsa di granulomi a livello degli organi interni (7). L'interesse per questa patologia nasce dal fatto che può essere trasmessa all'uomo, rappresentando un rischio soprattutto per gli operatori dei settori pesca, acquacoltura, lavorazione dei prodotti ittici e per gli acquariofili (3).

I micobatteri atipici sono stati spesso isolati dall'ambiente e dagli animali a sangue freddo in tutte le parti del mondo. La distribuzione così ampia, è dovuta alla loro capacità di crescere a diverse temperature, di utilizzare diversi nutrienti e di sopravvivere e moltiplicarsi in ambienti molto diversificati. Suolo umido, acque stagnanti, fango, fiumi, laghi, acque potabili, piscine ed acquari costituiscono i luoghi adatti alla loro sopravvivenza e alla loro moltiplicazione. Ben documentato è infatti il ruolo del suolo e dell'acqua come *reservoir* della malattia (9).

Pertanto, soprattutto in ambiente selvatico, il più delle volte si è costretti a segnalare positività non correlate a manifestazioni cliniche, senza poter stabilire con esattezza la genesi e soprattutto l'evoluzione dell'episodio. Scopo del presente lavoro è quello di dare un contributo, grazie all'attivazione di piani di monitoraggio per altre patologie, alla conoscenza sulla diffusione delle micobatteriosi ittiche in ambiente selvatico di alcuni biotopi acquatici del territorio italiano.

MATERIALI E METODI

Nel periodo compreso tra il 2008 e il 2010 sono stati monitorati 3 diversi biotopi dulciacquicoli (basso bacino idrografico del Po piemontese, Lago Maggiore e Lago di Como).

Analizzando i diversi siti di campionamento, nel basso bacino piemontese del fiume Po (provincia di Alessandria), sono stati campionati 130 soggetti appartenenti a 7 diverse specie ittiche, così suddivisi: 46 siluri (*Silurus glanis*), 31 cavedani (*Squalius cephalus*), 21 barbi (*Barbus barbus*), 18 carassi (*Carassius*

carassius), 7 pesci persico (*Perca fluviatilis*), 6 carpe (*Cyprinus carpio*) e 3 tinche (*Tinca tinca*).

Nel biotopo relativo al lago Maggiore (sponda occidentale, province di Novara e Verbano-Cusio-Ossola, denominato anche lago Verbano), sono stati esaminati 87 esemplari di fauna ittica, appartenenti a 9 specie ittiche, così suddivise: 41 rutili o gardon (*Rutilus rutilus*), 12 cavedani, 11 pesci persico, 10 lavarelli (*Coregonus lavaretus*), 6 bottatrici (*Lota lota*), 3 trote lacustri (*Salmo trutta lacustris*), 2 alose (*Alosa fallax*), 1 carassio e 1 pigo (*Rutilus pigus*).

Nel terzo ambiente, relativo ai due rami del lago di Como (province di Como e Lecco, denominato anche Lago Lario), sono stati invece prelevati 127 pesci appartenenti a 9 specie diverse, così suddivisi: 42 pesci persico, 26 persico sole (*Lepomis gibbosus*), 18 alose, 14 bottatrici, 9 lucci (*Esox lucius*), 8 lavarelli, 7 salmerini alpini (*Salvelinus alpinus*), 2 savette (*Chondrostoma soetta*) e 1 tinca.

Da tutti i campioni giunti in laboratorio sono stati prelevati porzioni di organi da sottoporre, previa decontaminazione, all'analisi specifica per la ricerca di micobatteri mediante semina su terreno in tubo (Löwenstein-Jensen e Stonebrink), incubati a incubati a 28°C ± 1°C e a 37°C ± 1°C, come indicato da Kent & Kubica (6). I terreni sono stati controllati giornalmente, al fine di rilevare l'eventuale crescita di colonie ascrivibili morfologicamente a micobatteri. I terreni sono stati controllati fino alla crescita di colonie o fino a 60 giorni dalla data di semina, trascorsi i quali il campione viene considerato negativo.

Su ogni ceppo isolato sono stati eseguiti i test di identificazione, seguendo le modalità indicate nel CDC Manual (6). I test colturali utilizzati sono stati la temperatura di crescita (a 28°C e a 37°C), la velocità di crescita (inferiore o superiore a 7 giorni), la capacità di produrre pigmento e la fotoinduzione. Le prove di inibizione selettiva utilizzate sono essenzialmente due, la crescita su Löwenstein-Jensen medium contenente il 5% di cloruro di sodio e la crescita su MacConkey Agar senza cristallio violetto. Infine, le prove biochimiche prese in considerazione sono la riduzione dei nitrati, l'ureasi, l'arilsulfatasi, l'idrolisi del Tween 80, la catalasi semiquantitativa, la catalasi termoresistente, l'utilizzo del ferro e l'utilizzo di inositolo, mannitolo e citrati come unica fonte di carbonio. Per le prove di inibizione selettiva e di identificazione biochimica, sono stati utilizzati sempre anche un controllo positivo ed uno negativo.

RISULTATI

In nessuno dei 344 esemplari esaminati si sono riscontrate lesioni macroscopiche riferibili a micobatteriosi.

Nell'ambiente fluviale alessandrino sono stati isolati due *Mycobacterium gordonae*, entrambi in siluri; la prevalenza è risultata pari all'1,5%; riportando invece il numero di positivi a quello dei siluri campionati (46), tale valore sale al 4,3%.

In ambiente lacustre del biotopo 2, sono risultati positivi tre esemplari, di cui due *M. chelonae* in lavarello e rutilo e un *M.*

gordonae in bottatrice. In questo caso la percentuale di positività sul totale dei campioni giunti al laboratorio è pari a 3,4%. Nel lago di Como invece stati isolati quattro positivi, di cui due ceppi di *M. chelonae* in pesce persico ed in persico sole, un ceppo di *M. fortuitum* ed uno di *M. marinum* in due esemplari di bottatrice. La percentuale di positività in questo biotopo è di 3,1%.

Tabella 1 – Suddivisione dei tre biotopi considerati, con numero dei pesci esaminati, numero di pesci positivi e relativa percentuale.

	Biotopo 1 Basso bacino piemontese fiume Po	Biotopo 2 Lago Maggiore	Biotopo 3 Lago di Como
Pesci esaminati	130	87	127
Pesci positivi	2	3	4
Percentuale positività	1,5%	3,4%	3,1%

DISCUSSIONE

Il ritrovamento in pesci selvatici di micobatteri atipici senza la presenza di lesioni macroscopiche riferibili a tubercolosi ittica in percentuali relativamente basse, porta a supporre che tali ambienti risultino contaminati in misura minore rispetto ad altri habitat salmastri dove la percentuale riscontrata in studi analoghi è risultata più alta (4, 8). Anche l'ambiente di allevamento può portare, in alcune condizioni, ad una maggiore manifestazione della patologia, sia con più elevate positività, sia con l'evidenziazione della caratteristica sintomatologia e di lesioni anatomopatologiche (1, 2). Il microcosmo che invece è presente negli acquari, permette, grazie al sistema di ricircolo presente, di esaltare tale patologia, con riscontro di prevalenze nettamente superiori sia in pesci ornamentali dulciacquicoli, che marini (10). Quindi, si evidenzia da questi dati, seppur preliminari, e da quelli forniti dall'abbondante bibliografia relativa ai pesci ornamentali e d'allevamento, che l'ambiente, insieme ad altre cause predisponenti quali il sovraffollamento e l'alimentazione regolano la genesi e le manifestazioni patologiche delle micobatteriosi atipiche (3, 9, 10).

Il ritrovamento di specie ritenute maggiormente frequenti nella genesi delle micobatteriosi ittiche in pesci selvatici (quali *M. marinum*, *M. fortuitum* e *M. chelonae*) conferma il loro potenziale ruolo patogeno; l'identificazione di 3 ceppi di *M. gordonae*, specie poco segnalata come patogena per i pesci, lascia spazio a possibili nuove implicazioni; l'estensione di tali tipi di ricerche potrà permettere probabilmente di ampliare lo spettro delle specie di micobatteri legate all'ambiente acquatico e al pesce.

Questo primo studio pertanto, permette di inquadrare i tre diversi habitat nella possibile diffusione delle micobatteriosi atipiche, seppure superficialmente ed in modo ancora insufficiente. Si può osservare come i due biotopi lacustri considerati, abbiano una percentuale di positività abbastanza simile, anche se il numero dei pesci esaminati è diverso. L'habitat fluviale, proprio per le caratteristiche intrinseche dell'ambiente, con una maggiore velocità dell'acqua, presenta positività inferiore.

Ulteriori ricerche, più approfondite e con campionamenti di pesci statisticamente significativi, potranno permettere di avvalorare le percentuali ritrovate o eventualmente di quantificarle meglio.

BIBLIOGRAFIA

1. Bozzetta E., Varello K., Giorgi I., Fioravanti M.L., Pezzolato M., Zanoni R.G. & Prearo M. (2010). *Mycobacterium marinum* infection in a hybrid striped bass farm in Italy. *J. Fish Dis.*, 33: 781-785.
2. Colorni A., Ankaowa M., Lindell D., Diamant A. & Gordin H. (1992). A systematic Mycobacteriosis in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* cultured in Eilat. *Israelian J. Aquaculture*, 44, 3: 75-81.
3. Ghittino P. (1985). Tecnologia e patologia in acquacoltura. Vol. II. Ed. Bono, Torino: 444.
4. Giorgi I., Ercolini C., Pezzolato M., Varello K., Gallo F., Bozzetta E., Pavoletti E. & Prearo M. (2008). Presenza di micobatteri atipici in una popolazione di cefali del Mar Ligure orientale. *Atti XV Convegno Nazionale S.I.P.I., Erice (TP), 22-24 ottobre 2008*: 28.
5. Giorgi I., Pascale M., Guarise S., Abete M.C., Forneris G. & Prearo M. (2007). Presenza di Micobatteri atipici in una popolazione selvatica di siluri (*Silurus glanis*) pescati nel tratto alessandrino del fiume Po. *Atti Convegno S.I.P.I., Castiglione della Pescaia (GR), 15-16 Novembre 2007*: 23.
6. Kent T.P. & Kubica P.G. (1985). Public health Mycobacteriology, a guide for the level III laboratory. *U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centres for Diseases Control, Atlanta, Georgia*.
7. Lansdell W., Dixon B., Smith N. & Benjamin L. (1993). Isolation of several *Mycobacterium* species from fish. *J. Aquat. Anim. Health*, 5: 73-76.
8. Varello K., Prearo M., Giorgi I., Serracca L., Pezzolato M. & Bozzetta E. (2010). Differential diagnosis of granulomatous lesions in a population of wild grey mullet from the Ligurian Sea in Italy. *J. Comp. Pathol.*, 143, 4: 317.
9. Wolinsky E. & Ryneerson T.K. (1968). Mycobacteria in soil and their relation to disease-associated strains. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 97: 1032-1037.
10. Zanoni R.G., Florio D., Fioravanti M.L., Rossi M. & Prearo M. (2008). Occurrence of *Mycobacterium* spp. in ornamental fish in Italy. *J. Fish Dis.*, 31: 433-441.

SUMMARY

In this study were tested 3 different freshwater environments, located in northwestern Italy. 344 fish were sampled from different species, which could be isolated 9 different strains of mycobacteria. More specifically, the positive rates were found: 1.5% in biotope 1 (lower River Po basin, in Piedmont), 3.4% in Verbano Lake (Lake Maggiore) and 3.1% in Lario Lake (Lake Como). The most frequent bacterial species was *Mycobacterium chelonae* and *M. gordonae*.

MONITORAGGIO DELLO STATO SANITARIO DI ALCUNE PARTITE DI *GARRA RUF* DA UTILIZZARSI IN CENTRI ESTETICI DELLA PROVINCIA DI TORINO (PIEMONTE, ITALIA)

Prearo M.¹, Arsieni P.¹, De Vita V.², Righetti M.¹, Di Donfrancesco B.¹, Amato G.², Pavoletti E.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino;

² La Casetta in Canada, Via Vittime delle Foibe, 19 – 10036 Settimo Torinese (TO)

Key words: *Garra rufa*, Stato sanitario, Centri estetici

INTRODUZIONE

Garra rufa è un piccolo ciprinide, diffuso in Medio Oriente, nelle acque dolci dell'Anatolia, Siria, Giordania e nei bacini idrografici del Tigri e dell'Eufrate, dove vive in acque con temperature comprese tra i 15°C e i 28°C. È una specie bentopelagica, che vive in branco. Presenta un corpo relativamente tozzo, allungato, con pinne robuste; la bocca, in posizione ventrale, presenta caratteristici barbigli. Si nutre prevalentemente di fitoplancton e detriti animali (1; 2; 3).

Da centinaia di anni questa specie viene utilizzata nei Paesi asiatici ed in particolare in Turchia, nella zona di Kangal, nell'ittioterapia per cure podologiche e per il trattamento di alcuni disturbi dermatologici (4; 8). Sono stati condotti alcuni studi scientifici per valutare l'effettiva efficacia dell'ittioterapia nel trattamento controllato della psoriasi; con tale sistema si possono ottenere benefici che si prolungano anche per alcuni mesi. Infatti, caratteristica di questa specie è quella di cibarsi anche della pelle malata o morta, senza intaccare le restanti parti del derma, asportando piccole porzioni di cute (4).

Controversi appaiono ancora gli studi sulla presenza o meno di un enzima presente nella saliva di questi pesci, il ditranolo, efficace nel trattamento della psoriasi, ma che può avere degli effetti collaterali, quali irritazioni cutanee, dovute a sensibilità individuale.

Grazie a queste sue capacità, questa specie ittica nei paesi d'origine ha fatto fiorire un florido mercato per il trattamento di patologie dermatologiche (7; 8). Negli ultimi anni questa tendenza si sta diffondendo su scala mondiale all'interno di centri termali e, in molti Paesi, la pratica denominata "fish pedicure", che consiste nell'immergere i piedi in una piccola vasca condizionata con questi pesci, si sta sviluppando anche in alcuni centri estetici. Attualmente in Italia questa pratica è poco diffusa, anche per la difficoltà oggettiva di intraprendere tale attività e la totale mancanza di controlli atti a verificarne l'idoneità sanitaria. Da ricordare che in molti Stati americani ed in Svizzera, l'utilizzo di questi pesci nei centri estetici sia vietato per questioni igieniche.

Nonostante *Garra rufa* sia una specie ittica poco conosciuta, sono stati più volte segnalati episodi di mortalità in soggetti utilizzati nell'ittioterapia (6).

Lo scopo del presente lavoro è quello di valutare lo stato sanitario di talune partite di *Garra rufa* acquistate da alcuni centri estetici di Torino direttamente da fornitori europei.

MATERIALI E METODI

Da giugno 2010 a luglio 2011, sono state analizzate con cadenza mensile, 14 partite diverse di *Garra rufa* provenienti da 3 diversi fornitori.

I pesci sono giunti al laboratorio vivi, in sacchetti da trasporto e sono stati sottoposti alle analisi routinarie, previa anestesia profonda (MS-222) e spinalizzazione di tutti i soggetti.

Sono stati condotti su tutti i campioni gli esami parassitologico e anatomopatologico, seguiti da un esame colturale su terreni di primo isolamento (Agar sangue e Tryptic Soy agar), mediante

prelievo da rene, fegato e cervello.

Inoltre, da tutti i soggetti si è approntato un esame colturale su terreni specifici (Löwenstein-Jensen e Stonebrink) per la ricerca di eventuali micobatteri atipici.

Nel mese di febbraio 2011 inoltre, è stata inviata al laboratorio una partita, già testata in arrivo nel mese di dicembre ed utilizzata a scopo estetico per circa un mese, in cui si è segnalata una lieve mortalità in vasca: anche per questo lotto, sono state effettuate tutte le analisi sopra descritte.

RISULTATI

In molti casi i pesci sono apparsi estremamente magri e le lesioni più frequenti sono da ricondursi ad una sofferenza branchiale aspecifica, con ipermucosità e lieve malattia branchiale. In alcuni soggetti si è evidenziato un quadro di anemia epatica.

I risultati sono riassunti nella Tabella 1.

Tabella 1 – Visualizzazione dei risultati nelle diverse partite testate.

N°	Mese	Esame AP	Esame PAR	Esame COL	Esame TBC
1	06/10	nn	neg	neg	neg
2	07/10	sm; iv	neg	neg	neg
3	08/10	nn	neg	neg	neg
4	09/10	nn	neg	neg	neg
5	10/10	mb	neg	pos AH	neg
6	11/10	ae	neg	neg	neg
7	12/10	nn	neg	neg	neg
8	01/11	ib; iv	neg	neg	neg
9	02/11	nn	neg	neg	neg
10	03/11	nn	neg	neg	neg
11	04/11	sm	neg	neg	neg
12	05/11	nn	neg	neg	neg
13	06/11	sm; iv	neg	pos AH	neg
14	07/11	nn	neg	neg	neg
7 bis	02/11	sm; iv; ib; ae	neg	pos ASO	neg

Legenda:

Esame anatomopatologico (AP); esame parassitologico (PAR); esame colturale (COL); esame colturale per micobatteri atipici (TBC); quadro nella norma (nn); soggetti magri (sm); ipermucosità branchiale (ib); malattia branchiale (mb); intestino privo di alimento (iv); anemia epatica (ae); risultato negativo (neg); risultato positivo (pos); positivo per *Aeromonas hydrophila* (AH); positivo per *Aeromonas sobria* (ASO).

L'esame parassitologico è risultato sempre negativo, mentre all'esame colturale è stato possibile isolare, in tre soggetti di due partite distinte, *Aeromonas hydrophila*, senza però riscontrare segni clinici patognomici all'esame autoptico. La ricerca di micobatteri atipici ha sempre dato esito negativo (Tabella 1).

La partita già testata nel mese di dicembre ed inviata nuovamente al laboratorio per le analisi dopo essere stata utilizzata per circa trenta giorni, ha presentato un quadro di maggiore sofferenza rispetto a tutti i lotti analizzati all'arrivo; infatti, dalle analisi condotte si è potuto osservare nella maggior parte degli esemplari testati, un eccessivo dimagrimento dei soggetti, con intestino totalmente privo di alimento, grave ipermucosità branchiale ed un quadro di anemia epatica. All'esame colturale è stato inoltre possibile isolare *Aeromonas sobria* da un unico esemplare. Anche in questo caso gli esami parassitologico e colturale per la ricerca di micobatteri atipici sono risultati negativi (Tabella 1; 7 bis).

DISCUSSIONE

Il monitoraggio che è stato effettuato mensilmente su alcuni esemplari di *Garra rufa* provenienti da partite importate per il loro utilizzo in alcuni centri estetici di Torino e provincia, ha permesso di valutare lo stato di salute dei soggetti acquistati prima di utilizzarli; in generale tutti i soggetti sono apparsi in ottime condizioni; a volte i pesci si presentavano magri e con l'intestino vuoto; il quadro di sofferenza branchiale era estremamente ridotto e si è potuto verificare solamente in due partite. Il ritrovamento all'esame colturale in 3 soggetti (provenienti da due partite diverse) di *Aeromonas hydrophila* senza segni clinici manifesti e con assenza di mortalità nell'intera partita, non rappresenta un'indicazione di un quadro patologico manifesto; infatti, molto spesso il ritrovamento di *A. hydrophila*, come anche di altri germi ubiquitari e caratteristici dell'ambiente acquatico (ad esempio *A. sobria*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens*, ecc.) in pesci ornamentali, rappresenta una eventualità abbastanza frequente (5). Le condizioni ambientali del microcosmo acquario, oltre allo stress che i pesci subiscono, possono esacerbare l'azione di questi patogeni condizionati e provocare patologie anche mortali.

La presenza di una bassa mortalità verificatasi nella partita importata a dicembre ed utilizzata durante il mese di gennaio, ha permesso di analizzare nuovamente il lotto di pesci, mettendo in luce un quadro di sofferenza generalizzata: i pesci erano estremamente magri, con intestino vuoto e branchie sofferenti. Anche il ritrovamento di *A. sobria* in un soggetto, non ha permesso di attribuire a tale specie batterica l'episodio di mortalità occorso. Tale quadro è senz'altro da ricondurre ad una eccessiva densità in cui il pesce è stato stabulato, ad una scarsa alimentazione artificiale dei soggetti (forse per migliorare le loro performance in vasca) e a forti fenomeni di stress ambientale (non è stato possibile ottenere informazioni sul loro utilizzo in vasca durante il mese di gennaio).

Resta da evidenziare come gli esami per la ricerca di micobatteri atipici, condotti su tutti gli esemplari testati, sono negativi.

Quindi, i dati ottenuti da questo studio preliminare permettono, seppur con una certa riserva, di affermare che le partite di *Garra rufa* in arrivo, godono di un buono stato di salute.

Questo dato appare molto confortante anche se non è stato possibile stabilire però l'effettivo mantenimento di tale stato di salute delle partite nel tempo. Sarebbe opportuno eseguire tutte le analisi in modo costante anche durante il loro utilizzo nei centri estetici, monitorando nel tempo i lotti impiegati ed il mantenimento del buono stato di salute, condizione imprescindibile per tale utilizzo. In base all'unico rilievo che ci è stato possibile effettuare in una partita già impiegata, sarebbe opportuno attuare controlli anche sullo stato di nutrizione e di benessere dei soggetti stabulati; un accorgimento che potrebbe ovviare a tali problemi potrebbe essere quello di utilizzare più partite per postazione e ruotare i soggetti, alimentandoli sufficientemente con mangime artificiale.

Attualmente, l'utilizzo di questi pesci nelle pratiche estetiche, si stanno diffondendo nelle grandi città del nostro paese; manca ancora una regolamentazione utile allo scopo e la consapevolezza da parte dei responsabili di tale attività e delle autorità sanitarie, dei potenziali rischi, che devono essere gestiti.

Disciplinare quindi tale attività, effettuando anche maggiori controlli sanitari ed igienici delle partite utilizzate, renderebbe certamente tale pratica più sicura.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Esmaeili H.R., Ebrahimi M., Ansari T.H., Teimory A. & Gholamhosseini G. (2009). Karyotype analysis of Persian stone lapper, *Garra persica* Berg, 1913 (Actinopterygii; Cyprinidae) from Iran. *Current Science*, 96, 7: 959-962.
- (2) Goren M. & Ortal R. (1999). Biogeography, diversity and conservation of the inland water fish communities in Israel. *Biolog. Conserv.*, 89: 1-9.
- (3) Gözükar S.E. & Çavaş T. (2004). A karyological analysis of *Garra rufa* (Heckel, 1843) (Pisces, Cyprinidae) from the eastern Mediterranean River basin in Turkey. *Turk. J. vet. Anim. Sci.*, 28: 497-500.
- (4) Grassberger M. & Hoch W. (2006). Ichthyotherapy as alternative treatment for patients with psoriasis: a pilot study. *eCAM*, 3, 4: 483-488.
- (5) Locatelli L., Pavoletti E., Moroni P., Cabra S., Gilli P., Prearo D. & Prearo M. (2003). Principali patologie batteriche riscontrate in pesci d'acquario nazionali e d'importazione. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 36: 42-52.
- (6) Majtán J., Černý J., Ofúkaná A., Takáč P. & Kozánek M. (2011). Mortality of therapeutic fish *Garra rufa* caused by *Aeromonas sobria*. *Asian Pacific J. Tropical Biomed.*: 1-3.
- (7) Riyaz N. & Riyaz Arakkal F. (2011). Spa therapy in dermatology. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprology*, 77, 2: 128-134..
- (8) Sayili M., Akca H., Duman T. & Esengun K. (2007). Psoriasis treatment via doctor fishes as part of health tourism: a vase study of Kangal Fish Spring, Turkey. *Tourism Management*, 28, 2: 625-629.

SUMMARY

The aims of present work is to verify the health status of some batches of *Garra rufa* purchased by some beauty salons in Turin. The monitoring was carried out monthly on some specimens, showed in general good health of all those arriving. Insufficient data instead on the health of the batches used in beauty salons.

Therefore regulated that activity and carry out even greater sanitary controls of the fish batches used, would certainly make this practice safer.

DESCRIZIONE DI UN CASO DI PLASMOCITOMA EXTRAMIDOLLARE IN UN GATTO

Puleio R.¹, Tamburello A.¹, Di Caccamo C., Loria G. R.¹

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia¹, Veterinario Libero Professionista ²

Key words: Plasmacytoma, Immunohistochemistry, dog.

SUMMARY

An 16 year old, male cat was presented with a rectal mass, that protruded through the anus. The paraffin-embedded material was investigated by standard Hematoxylin and eosin, and special staining techniques (Giemsa, Toluidine). The tumor was examined immunohistochemically for CD 79a, CD 3, mast cell tryptase, vimentin and citocheratine. Histologically, the mass was composed of neoplastic round cells. Immunohistochemistry was positive for CD 79. The diagnosis was consistent with an extramedullary plasmacytoma

INTRODUZIONE

Il plasmocitoma è una neoplasia costituita essenzialmente da plasma cellule a vari stadi di differenziazione; mentre il mieloma si localizza nel midollo osseo, i plasmocitomi extramidollari interessano i distretti anatomici diversi dalle ossa lunghe. Secondo il WHO il plasmocitoma viene definito come una neoplasia localizzata, composta da plasmacellule tumorali che esprimono anticorpi monoclonali (Platz et al. 1999).

Il plasmocitoma extramidollare è un tumore abbastanza frequente nel cane, ma raro nel gatto (secondo alcune statistiche rappresenta il 2.4% dei tumori felini). La localizzazione più frequente è rappresentata dalla cute e dalle mucose, mentre raramente si può localizzare a carico del retto. Gli Autori riportano il caso di un plasmacitoma rettale, confermato da indagini istologiche ed immunoistochimiche.

MATERIALI E METODI

Un gatto meticcio di 16 anni veniva visitato dal veterinario curante a seguito di una anamnesi che riferiva tenesmo e ematochezia. Alla visita clinica si evidenziava una massa nell'ultimo tratto del retto. L'ago aspirato della massa sottoposto a colorazione rapida (Diff Quick®), metteva in evidenza una popolazione di cellule rotonde che mostravano citoplasma debolmente basofilo e un nucleo spesso posto eccentricamente con dispersione cromatinica grossolana.

La massa asportata chirurgicamente veniva inviata all'Istituto Zooprofilattico della Sicilia, Laboratorio di Istopatologia e Immunoistochimica. Il nodulo veniva fissato in Formalina tamponata al 10%, per 24-48 ore. Dopo processazione veniva effettuata l'inclusione in paraffina, taglio e colorazione in Ematossilina-Eosina (fig. 1).

Immunoistochimica (IHC).

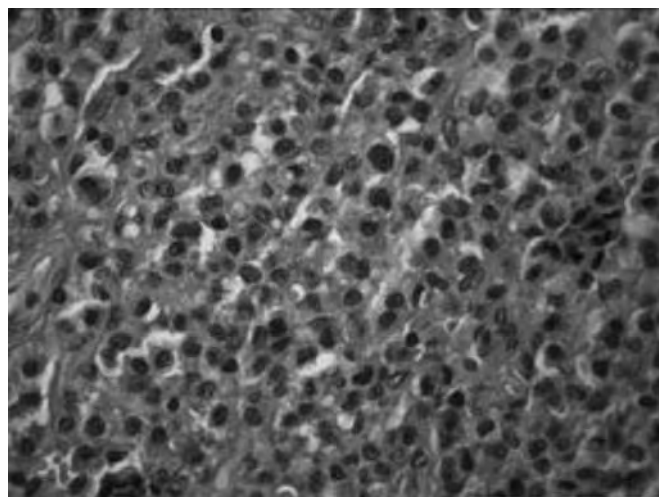
L'Immunoistochimica ha previsto l'allestimento di vetrini polilisinati, sottoposti al blocco delle perossidasi endogene tramite una soluzione di perossido d'idrogeno al 3% in metanolo. Lo smascheramento antigenico è stato eseguito con forno a microonde (due cicli a 750W per 5 minuti), in tampone citrato pH 6. Gli anticorpi primari utilizzati, sono stati (Tab.1): CD3 (Biocare®, policlonale di coniglio, cod. CP215A), CD79 (Dako®, policlonale di coniglio, cod. M7051, Mast cell tryptase (Dako®, monoclonale di topo, cod. M7052), Vimentina (Dako®, monoclonale topo, cod. M0725), Citocheratine (Dako®, monoclonale topo cod. M3515).

Anticorpo primario	Tipo ab	Diluizione
CD3 Biocare®	Policlonale	1:100
CD79 Dako®	Policlonale	1:50
Tryptase Dako®	Monoclonale	1:100
Vimentina Dako®	Monoclonale	1:400
Citocheratine Dako®	Monoclonale	1:200

Tab. 1

L'AB primario è stato incubato a temperatura di +4°C per l'intera notte. Come controllo negativo è stato utilizzato una sezione in cui l'uso dell'AB primario veniva sostituito con PBS; mentre come controllo positivo è stata usata una sezione di linfonodo per il CD 79 e CD 3, in quanto il CD 79 si lega ai linfociti B presenti nei follicoli, mentre il CD 3 marca i linfociti T e le plasmacellule delle aree paracorticali e della midollare. Per l'antigene tryptase è stato utilizzato una sezione di mastocitoma confermato anche dalla colorazione con blu di toluidina e giemsa. Le prove immunoistochimiche sono state eseguite mediante il metodo avidina-biotina-perossidasi (LSAB Dako®), utilizzando come cromogeno la DAB (diaminobenzidina tetraidrocloruro).

Fig. 1 Neoplasia E-E 63x



RISULTATI

Istologicamente la neoformazione non era delimitata da una capsula e costituita da cellule neoplastiche che infiltravano la sottomucosa rettale. Le cellule tumorali erano organizzate in lamine e cordoni delimitate da uno stroma fibrovascolare e mostravano citoplasma con margini distinti e occasionalmente un pallore paranucleare (arcoplasma), corrispondente ad un apparato di Golgi sviluppato. Nei nuclei si poteva osservare

una indentazione centrale ("cleaved"); talvolta posizionati eccentricamente, ipercromatici, modesta anisocitosi e anisocariosi. Si evidenziavano 1-2 mitosi per campo a 40x (fig. 1).

La positività alla immunohistochimica per CD 79 e la negatività per CD 3 (fig. 3 e 4) e l'antigene tryptase, hanno permesso di escludere altre neoplasie a cellule rotonde. Anche la ricerca per citocheratine e vimentina sono risultate negative. Le caratteristiche citologiche e l'organizzazione tissutale ci hanno confermato la diagnosi di plasmocitoma extramidollare.

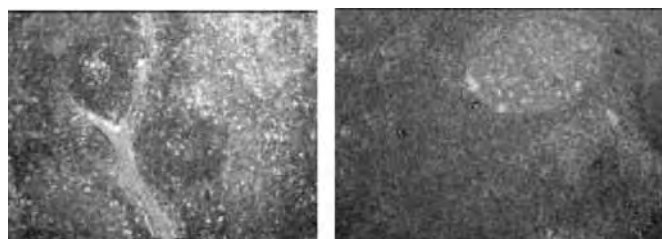


Fig. 2 IHC: Controlli positivi CD 79 e CD 3, 10x.

DISCUSSIONE

Nell'uomo il plasmocitoma extramidollare non è comune e si riscontra nel 5% dei tumori plasmocitari. Nel cane si ritrova frequentemente, localizzato soprattutto alla cute ed alle mucose. Nel gatto invece è una neoplasia infrequente ed ancor più rara la localizzazione intestinale. Platz et al. distinguono cinque tipi di plasmocitoma: ialino, maturo, polimorfo-blastico, inciso, asincrono. Nel nostro caso si riconosce il tipo inciso, in quanto caratterizzato da cellule che non sempre evidenziano l'alone paranucleare, ma nuclei spesso incisi e un moderato grado di anisocitosi. Infine sono presenti cellule multinucleate con 2-4 nuclei.

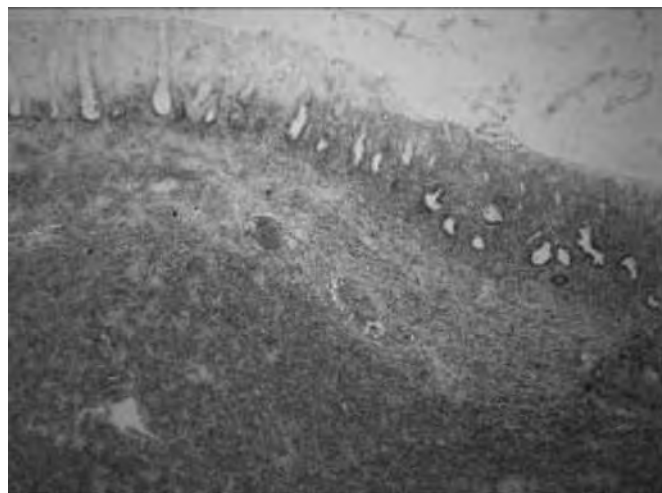


Fig. 3 CD 79 5x

L'immunohistochimica riveste un ruolo essenziale per una corretta diagnosi di un tumore infrequente. In questo caso è stato applicato il protocollo proposto da Fernandez e all. (Vet Pathol. 2005) per differenziare i tumori a cellule rotonde e soprattutto per chiarire una eventuale diagnosi differenziale con il linfoma e con il mastocitoma intestinale; quest'ultimo nella specie felina rappresenta il terzo tumore per ordine di frequenza dopo il linfoma e l'adenocarcinoma. Di grande interesse la possibilità di inserire nel pannello di immunohistochimica per differenziare le neoplasie a cellule rotonde, l'antigene MUM1 (Ramos-Vara et al. 2007) che sembra avere una maggiore specificità anche rispetto al CD79a.

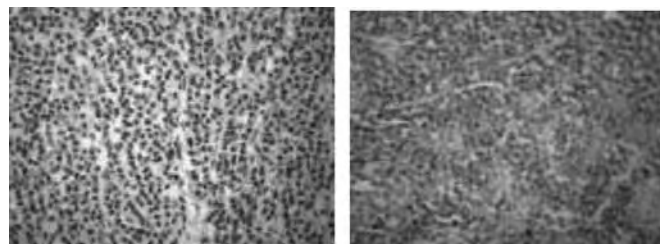


Fig. 4 IHC per CD 79a(40x) e CD3 (40x)

Il Plasmocitoma rettale è un'entità patologica ben conosciuta nel cane, mentre solo sporadiche segnalazioni sono state riportate nel gatto. Questo report vuole contribuire alla conoscenza delle neoplasie plasmocitarie intestinali del gatto e nel contempo validare il pannello di esami immunohistochimici per la differenziazione tra il linfoma e il mastocitoma intestinale.

Tale risultato rappresenta un punto di partenza per una più attenta valutazione delle neoplasie a cellule rotonde intestinali nella specie felina e di ulteriori approfondimenti diagnostici dei casi in collezione. In particolare, oggetto di un ulteriore studio sarà di verificare con una indagine retrospettiva e su un numero più ampio di casi, la validità dell'antigene MUM1, già proposto nel plasmocitoma del cane (Ramos-Vara et al. 2007).

BIBLIOGRAFIA

Fernandez NJ, West KH, Jackson ML, Kidney BA. Immunohistochemical and histochemical stains for differentiating canine cutaneous round cell tumors. Vet Pathol. 2005 Jul;42(4):437-45.

Luna, L. G. (1960). Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd Edit., McGraw-Hill, New York, USA, pp. 85, 94-95.

Majzoub M, Breuer W, Platz SJ, Linke RP, Linke W, Hermanns W. Histopathologic and immunophenotypic characterization of extramedullary plasmacytomas in nine cats. Vet Pathol. 2003 May;40(3):249-53.

Mellor PJ, Polton GA, Brearley M, Haugland S, Smith KC, Scase TJ, McNeil PE, Holloway A, Archer J, Powell RM, Villiers EJ, Herrtage ME, Argyle DJ, Day MJ. Solitary plasmacytoma of bone in two successfully treated cats. J Feline Med Surg. 2007 Feb;9(1):72-7. Epub 2006 Aug 2.

Michau TM, Proulx DR, Rushton SD, Olivry T, Dunston SM, Gilger BC, Davidson MG. Intraocular extramedullary plasmacytoma in a cat. Vet Ophthalmol. 2003 Jun;6(2):177-81.

Platz SJ, Breuer W, Pfliegerhaas S, Minkus G, Hermanns W. Prognostic value of histopathological grading in canine extramedullary plasmacytomas. Vet Pathol. 1999 Jan;36(1):23-7

Ramos-Vara JA, Miller MA, Valli VE. Immunohistochemical detection of multiple myeloma 1/interferon regulatory factor 4 (MUM1/IRF-4) in canine plasmacytoma: comparison with CD79a and CD20. Vet Pathol. 2007 Nov;44(6):875-84.

Schöniger S, Bridger N, Allenspach K, Mantis P, Rest J, Steeves E. Sinonasal plasmacytoma in a cat. J Vet Diagn Invest. 2007 Sep;19(5):573-7.

Zikes CD, Spielman B, Shapiro W, Roth L, Ablin L. Gastric extramedullary plasmacytoma in a cat. J Vet Intern Med. 1998 Sep-Oct;12(5):381-3.

IMPIEGO SPERIMENTALE DI UN VACCINO A DNA NEL CONTROLLO DEL CARCINOMA MAMMARIO DEL CANE

Puleio R.¹, Tamburello A.¹, Amici A.², Cavallo F.³, Vazzana I.¹,
Schiavo M. R.¹, Loria G. R.¹ e Di Marco V.¹

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia¹, Dipartimento di Biologia Molecolare, Cellulare e Animale, Università degli studi di Camerino ²,
Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Centro di Biotecnologie Università degli studi di Torino³

Key words: Her2, Immunohistochemistry, dog.

SUMMARY

Pet dogs represent a valuable pre-clinical model to assess the efficacy of oncology drugs. Additionally, canine cancer occurs with an incidence similar to that of humans and share many features with human tumours, including histological pattern, tumor genetics, biological behaviour and response to conventional therapies. Similarly, HER-2/neu oncoprotein is overexpressed in a proportion of canine breast cancer and can represent a valid tumor associated antigen, suitable target for translational cancer immunotherapy in dogs. In this study, we show that DNA vaccine against HER 2, associated with electroporation can induce an immune response detectable and long-lasting in the absence of side-effects.

INTRODUZIONE

L'uso di un vaccino che protegga nei confronti del carcinoma mammario è una delle ipotesi, che più attira l'attenzione dei ricercatori nella prevenzione e cura di tale patologia. Quaglino (2004) ha ottenuto risultati incoraggianti su topi transgenici inibendo ed interrompendo l'evoluzione della neoplasia con l'inoculazione di un vaccino plasmidico anti HER-2 che induceva una risposta anticorpale specifica.

In questa indagine gli autori riportano i dati ottenuti inoculando un gruppo di cani sottoposti a chirurgia per tumore mammario, successivamente diagnosticato come "Carcinoma in situ", con un vaccino plasmidico anti HER-2, per verificare la presenza di una risposta anticorpale specifica e le potenzialità immunogeniche del vaccino nel prevenire le recidive.

MATERIALI E METODI

Sono stati selezionati per la prova n. 12 cani di razza, età e taglia disomogenea, in quanto dipendente dal caso che veniva selezionato. I cani sono stati suddivisi in due gruppi differenti: gruppo A (controllo) costituito da sei cani vaccinati con il plasmide di controllo (pVAX), e gruppo B (challenge) costituito da sei animali vaccinati con il plasmide contenente il gene codificante per HER-2 (HuRt). I 6 cani facenti parte del gruppo B, sono stati selezionati tra i soggetti sottoposti a chirurgia per l'asportazione di un tumore mammario, successivamente diagnosticato come Carcinoma e iperesprimente Her2, secondo una metodica immunoistochimica messa a punto nel nostro laboratorio. I cani in esperimento non hanno ricevuto altri trattamenti durante tutto il periodo di osservazione e sono stati controllati con cadenza periodica per un periodo di 90 giorni, per registrare eventuali reazioni locali, sintomi clinici e per effettuare le indagini di laboratorio utili ad evidenziare la presenza di anticorpi. Successivamente i cani sono stati controllati mensilmente per due anni, per il monitoraggio di eventuali recidive neoplastiche.

Preparazione del vaccino.

Il vaccino è costituito da un plasmide chimera, che codifica per il dominio extracellulare e transmembrana della p185^{neu} umane

e di ratto (HuRt). A tal fine alcune sequenze nucleotidiche codificanti la p185^{neu} sono state inserite all'interno di un vettore plasmidico (pVAX). Il vaccino è stato preparato in condizioni di sterilità avendo una concentrazione finale per dose di 400mg DNA in un volume di 500ml(Fig.1).

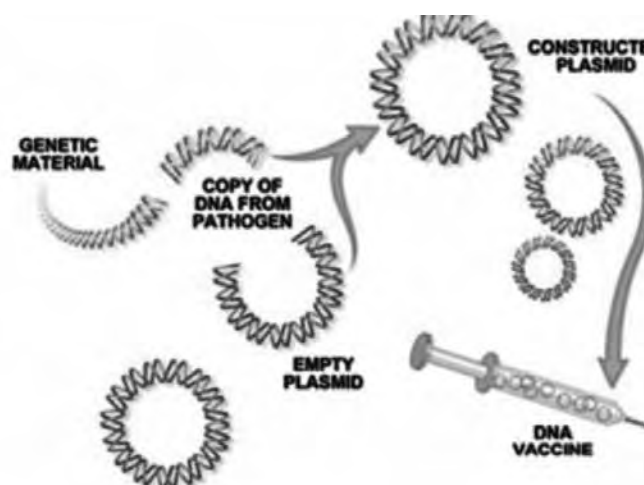


Fig. 1 Schema preparazione del vaccino (da Vical, DNA vaccine)

Protocollo vaccinale.

L'inoculo è stato effettuato con una siringa monouso da 1 ml nella coscia sinistra all'interno dei muscoli semitendinoso/semimembranoso. Il metodo ha previsto l'associazione di impulsi elettrici alla somministrazione del plasmide, permettendo di massimizzare la loro penetrazione all'interno delle cellule tumorali. L'elettroporazione è stata effettuata mediante CLINIPORATOR™ (IGEA, Modena, Italy). Tale strumento è in grado di erogare impulsi e di misurare la corrente che attraversa il tessuto, permettendo l'esatta dosimetria del trattamento. Una delle teorie più accreditate prevede che la struttura della membrana cellulare (il doppio strato lipidico), venga modificata per gli impulsi elettrici; si crea in tal modo una maggiore idratazione della membrana che determina, a sua volta, un aumento della permeabilità cellulare (Mir *et al.*, 2006). Il protocollo prevede che subito dopo l'iniezione del vaccino venga applicato l'elettrodo lineare che trasmette nel punto di inoculo un impulso ad alto voltaggio (450 V, 50 µs, 3kHz) seguito, dopo una pausa di un secondo da una serie di 8 impulsi a basso voltaggio (110V, 20 ms, 3kHz, pausa tra gli impulsi di 300 ms). Tutti i cani hanno ricevuto tre dosi booster con le stesse modalità del primo inoculo ogni trenta giorni.

Indagini sulla tossicità del vaccino.

E' stata effettuata una analisi statistica per verificare se la media dei valori emato-chimici del gruppo dei vaccinati con HuRt differisce significativamente da quella del gruppo dei

vaccinati solo con il plasmide.

Sono stati messi a confronto sei cani ai quali è stato somministrato il vaccino plasmidico HuRt e sei vaccinati con solo plasmide (Pvax1). Sono stati misurati i valori di creatinina, urea, gpt, got, ggt, Na ed K, proteine totali a distanza costante di tempo. I dati sono stati elaborati utilizzando il software statistico SAS System V8. La procedura implementata è stata quella della analisi della varianza per misure ripetute. Inoltre per valutare eventuali effetti cardiotossici causati dalla vaccinazione con HER2 e riscontrati in alcuni pazienti umani sottoposti a trattamenti con Herceptin (Keefe et al., Cancer 2002) i cani vaccinati sono stati sottoposti a visita cardiologica con approfondimenti radiografici e ecocardiografici.

Analisi al citofluorimetro.

Il dosaggio degli anticorpi anti p185^{neu} è stato effettuato tramite analisi al citofluorimetro. I sieri sono stati incubati con cellule che iper-esprimono la chimera p185^{neu} di uomo e di ratto (JURKAT HuRt). Tali cellule sono state suddivise nei tubi per il citofluorimetro a flusso (FacsScan Becton Dickinson) nella dose di 2×10^5 cellule/tubo. Alle cellule sono stati aggiunti i diversi sieri da saggiare (diluiti 1:10), lasciati per 45' a 4°C. L'eccesso di anticorpi è stato poi eliminato con un lavaggio in PBS-2% di albumina bovina sierica (BSA, Sigma, quindi è stato aggiunto un anticorpo di coniglio anti-IgG di cane FITC (diluito 1:30) (Jackson Immunoresearch). I campioni sono stati incubati per 30 minuti in ghiaccio e quindi sono stati effettuati 2 lavaggi in PBS-2%. La presenza degli anticorpi IgG è stata valutata come intensità di fluorescenza ed espressa come serum binding potential (sbp).

RISULTATI

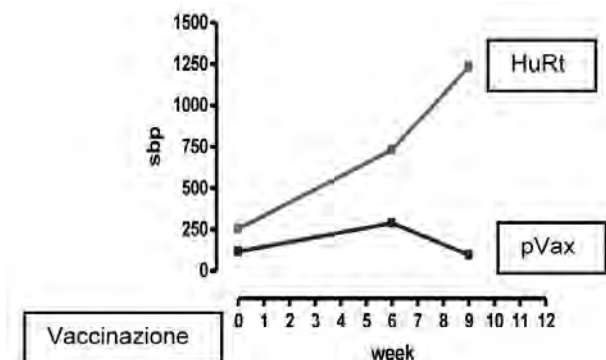
Risultati tossicità vaccino.

In nessun caso si è riscontrata una significatività della interazione dell'effetto del vaccino nel tempo per tutti gli otto diversi valori ematici esaminati. Inoltre i p-values sono risultati sempre maggiore di 0.05 ($P > 0.05$). Infine in entrambi i gruppi non si sono osservate patologie cardiache o peggioramenti di quelle già in atto prima della vaccinazione.

Risultati citofluorimetria.

In Figura 2 sono riportati i dati relativi alle variazioni nella concentrazione serica delle IgG specifiche anti HER-2, in risposta allo stimolo vaccinale, rilevate tra il gruppo di cani controllo (gruppo A) e il gruppo di cani vaccinati (gruppo B). I dati ottenuti dimostrano che è stata indotta una produzione di anticorpi IgG contro la p185^{neu} uomo/ratto nei cani vaccinati con HuRT (gruppo B), in modo statisticamente significativo rispetto ai cani vaccinati con il plasmide di controllo.

Fig. 2 Valori medi degli anticorpi anti HuRT e anti pVax indotti dalla vaccinazione espressa come serum binding potential.



DISCUSSIONE

HER2 rappresenta l'oncoantigene ideale, in quanto mostra un livello di espressione basso in cellule e tessuti normali, mentre nel 20% circa dei carcinomi mammari viene iperespresso (Lollini et al., Nature Rev.Cancer, 2006). L'ostacolo è rappresentato dal fatto che come tutti gli oncoantigeni anche HER2 è un antigene self, quindi non riconosciuto come estraneo dal sistema immunitario. Per questo è stata sintetizzata una "chimera" che possa esprimere sia l'antigene HER2 umano che di ratto. L'analogia tra HER 2 umano e quello canino è del 92%(Peruzzi et al., Vaccine 2008), per questo motivo abbiamo utilizzato un vaccino plasmidico contenente DNA codificante per HER2 umano e di ratto. Infatti da un lato l'alta omologia con HER2 umano, dall'altra la presenza di elementi riconosciuti come non-self (ratto) hanno permesso di potenziare la risposta del sistema immunitario con la produzione di anticorpi specifici. Gli anticorpi in questione potrebbero agire direttamente legandosi al recettore HER2, bloccando il sito recettoriale e non permettendo che il ligando possa attivare il recettore, tramite fosforilazione.

Il vaccino plasmidico anti HER-2 induce pertanto una protezione immunitaria verso i carcinomi mammari HER-2 positivi.

L'applicazione di una terapia vaccinale in cani affetti da carcinoma mammario e trattati chirurgicamente potrebbe conferire una maggiore resistenza al progredire della malattia e essere utile a prevenire recidive.

Inoltre il modello canino ha confermato di essere un utile ausilio nella ricerca contro il cancro permettendo la sperimentazione di un vaccino che in futuro potrà essere applicato anche nella donna.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991 Nov;19(5):403-10.
- 2) Keefe DL. Trastuzumab-associated cardiotoxicity. *Cancer*. 2002 Oct 1;95(7):1592-600.
- 3) Lollini PL, Cavallo F, Nanni P, Forni G. Vaccines for tumour prevention. *Nat. Rev. Cancer* 2006 Mar;6(3):204-16.
- 4) Martin de las Mulas J., Ordas, Y. Millan J., Fernandez-Soria V., and Ramon y Cajal S. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas. An immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study - *Breast Cancer Research and Treatment* (2003) 80: 363-367
- 5) Mir L.M. . Bases and rationale of the Electrochemotherapy. *EJC supplements* 4 2006 38-44
- 6) Misdorp W., Else R.W., Hellmèn E., Lipscomb T.P., Histological classification of mammary tumors of the dog and cat. In WHO International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals, volume 7 di 2nd, Armed Force Institute of Pathology, American Registry of Pathology, 2001
- 7) Peruzzi D, Mesiti G, Ciliberto G, La Monica N, Aurisicchio L. Telomerase and HER-2/neu as targets of genetic cancer vaccines in dogs. *Vaccine*. 2010 Feb 3;28(5):1201-8. Epub 2009 Nov 26.
- 8) Quaglino E., Iezzi M., Mastini C., Amici A., Pericle F., Di Carlo E., Pupa S., De Giovanni C., Spadaio M., Curcio C., Lollini P., Musini P., Forni G. and Cavallo F. Electroporated DNA Vaccine Clears Away Multifocal Mammary Carcinomas in Her-2/neu Transgenic Mice - *Cancer Research*(2004) 64, 2858-2864
- 9) Rungsiapat A., Tateyama S., Yamaguchi R., Uccida K., Miyoshi N. and Hayashi T. Immunohistochemical Analysis of c-yes and c-erbB-2 Oncogene Products and p53 Tumor Suppressor Protein in Canine Mammary Tumors - *J. Vet. Med. Sci.* (1999) 61(1): 27-32

STUDIO DEI MARCATORI GENETICI NEL GENOMA DELLA POPOLAZIONE BOVINA SICILIANA

Reale S., Lupo T., Ciprì V., Gargano V., Piazza M., Migliazzo A., Vitale F.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Area Biologia Molecolare

Key words: PCR, Microsatelliti, DNA

ABSTRACT

The molecular biology and the use of short tandem repeats (STRs) as DNA markers for genotyping (DNA fingerprinting) are a valid support for identification of cattle pedigrees. This method represents a valid choice in the control of traceability thanks to its high sensibility and its discriminant power and is important to certify the unequivocal genetic identity of the cattle breed also in presence of a little quantity of samples. The amplified microsatellite markers are those recommended by the International Society of Animal Genetics (ISAG). In this preliminary study we examined the abundance of each locus in a representative number of bovine subjects bred in Sicily.

Introduzione

L'obiettivo finale dell'indagine di genotracciabilità animale, è la garanzia del consumatore attraverso l'assicurazione di qualità. Le strategie di genotipizzazione sono volte alla definizione del profilo genetico dei singoli individui attraverso l'identificazione di sequenze STRs. Le metodologie applicate sono capaci di assicurare la tracciabilità delle carni lungo le filiere produttive e il controllo dei corretti campionamenti animali negli allevamenti. Già da tempo studi di genetica di base mirati ai locus polimorfici, sono stati sviluppati per chiarire le basi molecolari della diversità dei soggetti allevati. Come conseguenza della stretta integrazione dei bovini nella catena alimentare umana, le analisi forensi riguardanti il settore alimentare, sono ormai all'ordine del giorno. Attualmente gli studi di popolazione sono eseguiti attraverso l'applicazione di protocolli standardizzati che impiegano 11 locus polimorfici definiti STR. Questi sono: BM2113, ETH3, ETH10, ETH225, BM1824, INRA023, SPS115, TGLA53, TGLA122, TGLA126, and TGLA227 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7). Le sequenze attestate sono quelle raccomandate dall'International Society for Animal Genetics, per la definizione di uno standard necessario alla tipizzazione bovina attraverso le STR. La tecnica prevede essenzialmente l'uso di PCR ed elettroforesi capillare. La capacità discriminativa degli alleli viene studiata attraverso lo stabilimento della frequenza allelica nella popolazione bovina del territorio. Le maggiori differenze genetiche sono attese tra animali allevati in zone tra loro lontane.

MATERIALI E METODI

In questo studio preliminare sono stati analizzati 231 campioni da altrettanti animali per la definizione dei pannelli allelici relativi agli 11 locus raccomandati dall'ISAG.

I campioni di sangue intero sono stati estratti mediante estrattore automatico (Thermo Fischer) e un kit specifico di estrazione adatto ad ogni tipo di matrice (One for All Qiagen). In generale un volume di 100 µl di sangue è stato estratto sulle apposite piastre da microtitolazione, secondo le istruzioni del kit, per ottenere 150 µl di soluzione finale ad una concentrazione di DNA tra 10 e 100 ng/µl. Il pannello di alleli studiato è stato amplificato con una miscela di coppie di primers specifiche per i locus caratterizzanti, in cui uno degli oligomeri è marcato con un particolare fluorocromo (FAM, NED, JOE, VIC). In tal modo viene approntata una reazione multiplex in cui, frammenti di peso molecolare simile sono distinguibili perchè diversamente marcati, mentre frammenti di peso molecolare molto diverso, possono anche avere lo stesso fluorocromo. I gruppi fluorescenti infatti

sono solo 4 e il codice di distinzione risulta dalla combinazione tra tipo di fluorocromo e taglia dei frammenti. Il test di amplificazione del pannello di 11 microsatelliti per ciascun campione, è stato condotto impiegando le miscele già pronte del kit Stock Mark per genotracciabilità bovina (Applied Biosystems). In particolare la miscela di reazione è stata creata in un tubo da 0.2 ml come segue: StockMarks PCR Buffer, dNTP mix, AmpliTaq Gold DNA Polymerase, amplification primer mix, 1 µl (10 ng) di DNA, acqua fino ad un volume finale di 15 µl. Il programma di amplificazione è stato impostato come segue: denaturazione iniziale a 95°C for 10 min, 31 cicli con le ripetizioni 94°C per 45 sec, 61°C per 45 sec, 72°C per 1 min, estensione finale a 72 per 1 min e incubazione a 25°C per 120 min. Dopo la PCR, ciascun amplificato è stato diluito con 45 µl acqua per PCR e 1 µl della nuova mix è stata mescolata a 11.5 µl of Formamide deionizzata e 0.5 µl di GeneScan-350 ROX (Applied Biosystems), come standard di pesi molecolari. Le miscele di reazione sono state sottoposte al programma di amplificazione raccomandato che comprende una prima denaturazione a 95 °C per 3 min, poi poste in ghiaccio fino al momento dell'iniezione all'analizzatore genetico ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) preimpostato con l'opportuno modulo di analisi. I picchi relativi ai frammenti caratterizzanti, sono stati analizzati mediante il software GeneScan mentre i profili di animali diversi sono stati confrontati con il software GeneMapper (Applied Biosystems). La frequenza allelica è stata calcolata come rapporto percentuale tra il numero di volte con cui si presenta ciascun allele nel gruppo di animali considerato e il numero totale degli alleli esaminati. La tabella 1 mostra la lista dei primers marcati, gli intervalli di pesi molecolari previsti in ciascun locus e i colori relativi ai marcatori.

RISULTATI E DISCUSSIONI

Gli autori presentano in questo lavoro i dati di frequenza di marcatori genetici relativi a un gruppo di 231 campioni prelevati da bovini meticcii allevati in diverse parti della Sicilia e rappresentativi della popolazione autoctona.

La fig1. mostra un esempio rappresentativo di picchi ottenuti all'analizzatore genetico, derivati dall'amplificazione degli alleli nei locus consigliati. Tutti gli elementi considerati, (STRs), sono dei motivi dinucleotidici che formano delle unità di ripetizioni semplici o strutture variabili. I picchi sono analizzati per elettroforesi capillare al 310 ABI PRISM Genetic Analyzer ed elaborati mediante il software Genotyper e GeneScan (Applied Biosystems). All'interno di ogni locus sono possibili un numero discreto di picchi che nel loro insieme rappresentano e caratterizzano i soggetti. La differente rappresentatività dei vari alleli in ogni locus, può dipendere dalle razze, dagli incroci eseguiti, dall'adattamento genetico. Questo fa sì che le varie frequenze alleliche possano essere differenti in popolazioni autoctone diverse, cosicché, ai fini della genotracciabilità, è necessario poter interpretare gli alleli sulla base delle frequenze alleliche tabellate per la regione d'origine. Per tale ragione gli autori hanno condotto un progetto di individuazione e tabulazione delle frequenze alleliche nella popolazione bovina siciliana. Il risultato dell'indagine è dato proprio da una tabella (dati non mostrati), delle frequenze alleliche utile a calcolare, entro un opportuno intervallo di confidenza e con un probabilità del 95%, la paternità/maternità o l'identità tra due

soggetti. Nella ricerca dell'identità genetica in particolare si sfrutta il fatto che la probabilità che due individui diversi possiedano lo stesso pattern genetico è uguale alla frequenza di quel genotipo nella popolazione in esame e che la frequenza di un genotipo caratterizzato da più loci è uguale al prodotto delle frequenze di ogni singolo genotipo (locus) osservato: m

$$P = \prod P_k \text{ con } P_k = \text{Probabilità}$$

di identità al locus K $k=1$

Nel caso dell'indagine di parentela invece, si verifica l'ipotesi di verosomiglianza attraverso l'impiego delle frequenze alleliche individuate, nel calcolo delle varie combinazioni possibili di omozigosi ed eterozigosi per ciascun locus. La nomenclatura adottata è basata sul numero delle unità ripetute ed è quella raccomandata dall'ISAG per i sistemi di tracciabilità umana. Quindi, infine, si può asserire che per i processi di identificazione animale e per gli accertamenti di identità, si sfrutta il fatto che in ciascun locus, ci può essere una abbondanza di alcuni alleli e che questo marca le differenze genetiche dei soggetti allevati in diverse regioni del paese. La numerazione crescente (1-26), degli alleli è ovviamente arbitraria e si rinnova all'interno di ogni locus, in ordine crescente del Peso Molecolare di ciascuna banda amplificata. L'allele 7 per esempio, è maggiormente rappresentato nel locus TGLA126, mentre il 5 ha una frequenza di 0.40 in SPS115.

I picchi 25 e 26 in TGLA122, potrebbe spiegare gli incroci tra bovini autoctoni siciliani e soggetti di altre razze. Inoltre gli alleli 13 e 14 nel locus INRA23, sono spesso rappresentati nella maggior parte degli allevamenti siciliani. L'obiettivo di questo lavoro preliminare, è la determinazione e la caratterizzazione del pannello completo delle frequenze alleliche relative ai bovini isolani, ma i dati sono ovviamente ancora incompleti ai fini della rappresentatività dell'intera popolazione.

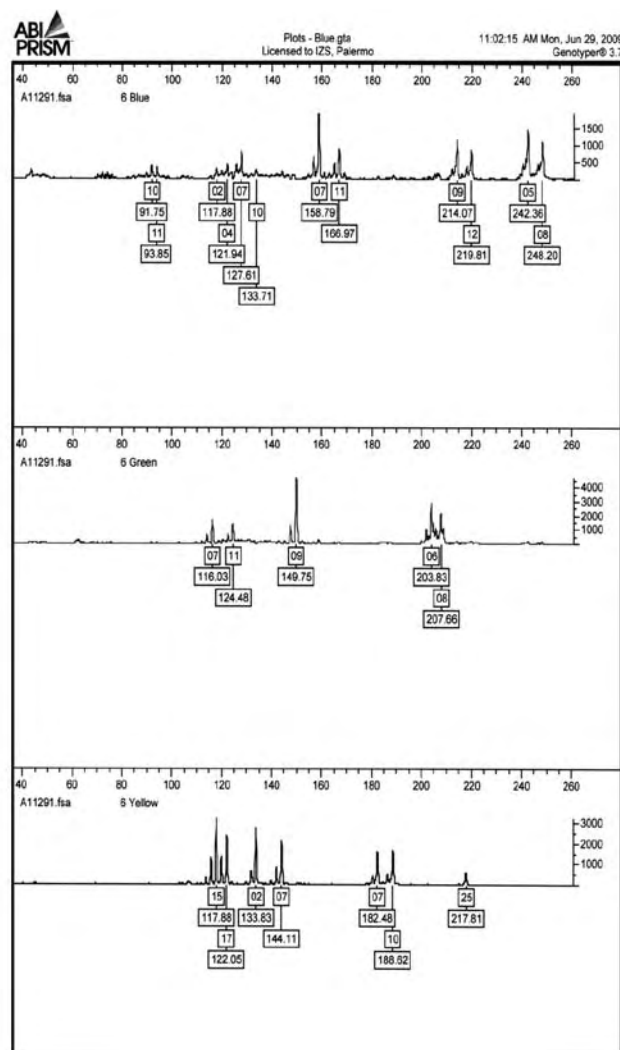
Il pannello mostra come alcuni alleli sono uniformemente distribuiti mentre altri si ritrovano in modo assolutamente discontinuo.

Da un punto di vista zoologico, non è al momento noto il significato funzionale della differente distribuzione degli alleli nella popolazione siciliana, ma potrebbe essere interessante confrontarla con quella di altre regioni italiane. Si può ipotizzare che potrebbero esistere delle associazioni con la suscettibilità ad agenti patogeni e zoonotici, con parametri fisiologici ed epidemiologici.

Locus	Marcatura	bp
TGLA227	FAM-BLU	64-115
BM2113	FAM-BLU	116-146
TGLA53	FAM-BLU	147-197
ETH10	FAM-BLU	198-234
SPS115	FAM-BLU	235-265
TGLA126	JOE-VERDE	104-131
TGLA122	JOE-VERDE	134-193
INRA23	JOE-VERDE	193-235
ETH3	NED-GIALLO	90-135
ETH225	NED-GIALLO	135-165
BM1824	NED-GIALLO	170-218

Tab.1 Lista dei locus e marcatura dei primers impiegati, intervallo in paia di basi comprendente tutti i possibili alleli amplificabili l'interno dei locus

Fig. 1. Analisi grafica degli amplificati al sequenziatore ABI PRISM 310, con il software Genemapper



BIBLIOGRAFIA

1. Bär W., Brinkman B., Budowle B., Carracedo A., Gill P., Lincoln P., Mayr W. & Olaisen B. (1997) DNA recommendations. Further report of the DNA commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. International Society for Forensic Haemogenetics. *International Journal of Legal Medicine* **110**, 175-6.
2. Barendse W., Armitage S.M. & Kossarek L.M. (1994) A genetic linkage map of the bovine genome. *Nature Genetics* **6**, 227.
3. Bishop M.D., Kappes S.M., Keele J.W. *et al.* (1994) A genetic linkage map for cattle *Genetics* **136**, 619-39.
4. Georges M. & Massey J. (1992) *Polymorphic DNA markers in Bovidae*. World Intellectual Property Organization, Geneva (Patent application WO PUBL NO 92/13102).
5. Gill P., Brinkmann B., D'Aloja E. *et al.* (1997) Considerations from the European DNA profiling group (EDNAP) concerning STR nomenclature. *Forensic Science International* **87**, 185-92.
6. Steffen P., Eggen A., Dietz A.B., Womack J.E., Stranzinger G. & Fries R. (1993) Isolation and mapping of polymorphic microsatellites in cattle. *Animal Genetics* **24**, 121.
7. Sunden S.L.F., Stone R.T., Bishop M.D., Kappes S.M., Keele J.W. & Beattie C.W. (1993) A highly polymorphic bovine microsatellite locus: BM2113. *Animal Genetics* **24**, 69.

IMPORTANZA DELL'IMPIEGO IN SERIE DI DIFFERENTI METODI SIEROLOGICI NELL'AMBITO DEL PIANO DI SORVEGLIANZA E PER LA CONFERMA DELL' ANEMIA INFETTIVA EQUINA

¹Ricci L., ¹Forletta R., ¹Gasperetti L., ²Caciolo D., ²Sabatini S., ²Scicluna M. T., ²Autorino G. L.

¹Centro Referenza per l'Anemia infettiva degli equini, ²Centro di Referenza Nazionale per malattie degli equini, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Via Appia Nuova 1411, 00178 ROMA

Keywords: Equine Infectious Anemia, diagnosis, immunoblot

ABSTRACT

The Agar Gel Immunodiffusion (AGID) and ELISA are the tests in use today for the detection of Equine Infectious Anemia (EIA) antibodies in equids. While the latter can detect antibodies somewhat earlier and at lower concentrations than the former, the AGID is still considered the confirmatory method owing to its higher specificity. The immunoblot (IB) is recommended by World Organisation Animal Health (WOAH) as an alternative confirmatory test in case of ELISA/AGID discordant results. The National Reference Centre (NRC) has adopted IB since 2009, to test all samples with equivocal results (positive-doubtful C-ELISA/negative AGID). Over the 2009-2011 period, 1552 samples had been tested by the NRC to confirm EIA diagnosis. Among the former, 814 were confirmed positive. Further analysis in IB was carried out for 243 samples; 43 of the 126 (34%) equivocal/positive ELISA samples were confirmed positive by IB because reactive with an EIA specific pattern. Results obtained demonstrated the greater sensitivity of the ELISA, optimal for screening when compared to AGID. The in series use of ELISA and AGID and/or IB, increases the overall sensitivity and specificity of EIA diagnosis, a low prevalent infection.

INTRODUZIONE

Considerati i problemi connessi alla diagnostica virologica, a partire dagli anni '70 è stata privilegiata per l'Anemia Infettiva Equina (AIE) la diagnosi sierologica. L'AGID per lunghi periodi è stato l'unico metodo disponibile, ma a partire dagli anni '90 è stato spesso sostituito dall'ELISA, impiegato soprattutto come metodo di screening. In Italia, i D.D.M.M. 1976 e 1999 definiscono che i casi positivi, riscontrati presso la rete dei laboratori autorizzati alla diagnosi, siano confermati dal Centro di Referenza per l'Anemia Infettiva Equina (CRAIE).

L'ELISA per la sua elevata sensibilità è in grado di svelare anticorpi più precocemente ed a titoli al di sotto della soglia di rilevabilità dell'AGID. Tuttavia, per la sua maggiore specificità, quest'ultimo è ancora considerato il test di conferma. Per dirimere i casi discordanti tra ELISA ed AGID, il Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals OIE (Manuale OIE) (7) prevede la possibilità di impiego dell'IB, che ricerca anticorpi diretti contro le tre principali proteine del virus: la proteina capsidica p26, la glicoproteina dell'envelope gp45 (TM o transmembrana) e la gp90 (SU o di superficie). L'iniziale produzione di anticorpi diretti verso le due glicoproteine è seguita soltanto più tardi ed in maniera meno intensa dalla produzione di anticorpi contro la p26, proteina più abbondante ed antigenicamente stabile che ancora oggi viene impiegata in maniera quasi esclusiva in ELISA ed AGID come raccomandato anche dal Manuale OIE (5;6). L'evoluzione della risposta immunitaria non permette di tralasciare nella diagnosi la ricerca di anticorpi diretti verso la gp45 e la gp90, quest'ultima di recente introduzione in alcuni test ELISA commerciali, ed entrambe previste insieme alla p26 nell'IB.

La ricerca contemporanea delle tre proteine virali e la maggiore sensibilità dell'IB permettono di ottenere una diagnosi più precoce, confermando positività non facilmente diagnosticabili in AGID (4). La frequenza di reazioni al limite per AIE nell'AGID, diversamente da altre patologie come la Leucosi Bovina, e la possibile associazione ad un'attiva replicazione virale, come ampiamente dimostrato in bibliografia, rafforzano il valore dell'IB nell'anticipare la diagnosi. Questo per non tralasciare soggetti AGID negativi ma comunque infetti, che garantiscono la persistenza dell'infezione e alimentano la diffusione del contagio. L'efficacia del sistema diagnostico in uso può essere garantita soltanto dall'identificazione tempestiva delle positività, che, accanto alla corretta gestione dei focolai, può ridurre l'incidenza dei nuovi casi e la persistenza dell'infezione come auspicato nel Piano di Controllo per l'AIE.

Dal 2009, il CRAIE ha introdotto l'impiego dell'IB per la conferma dei casi ELISA dubbi-positivi/AGID negativi che è già previsto nel "three tier lab system" proposto da alcuni studiosi americani esperti del settore. Tale sistema è adottato in alcuni stati americani e prevede un esame iniziale dei campioni con diversi ELISA utilizzati in serie; in caso di positività a più test con caratteristiche differenti e negatività dei campioni in AGID, viene utilizzato l'IB come test discriminatorio (3).

Il presente contributo vuole evidenziare i dati ottenuti nel corso di circa due anni e mezzo di attività.

MATERIALI E METODI

Per la conferma dell'AIE, lo schema diagnostico adottato dal 2009 prevede l'esame del campione in parallelo mediante ELISA ed AGID e l'esecuzione dell'IB sui sieri reattivi in ELISA, non confermati in AGID (1; 7).

Il test immunoenzimatico impiegato è un in-house C-ELISA che ricerca anticorpi contro la p26 ricombinante (2; 7; 8).

L'AGID è stata eseguita utilizzando in parallelo il test di Coggins descritto nel D.M. 4-12-1976, e la tecnica prevista nel Manuale OIE (7), impiegando in entrambi i casi la p26 ricombinante utilizzata nell'ELISA (2; 8).

L'IB è stato eseguito come descritto da Issel *et al.* (4; 8). Per l'interpretazione dei risultati, un campione è considerato positivo se presenta una reattività maggiore del controllo positivo verso due delle tre principali proteine virali, compresa la p26; si ipotizza che la reattività esclusiva verso la p26 possa essere dovuta a reazioni crociate con altri lentivirus, pertanto ritenute aspecifiche per il virus dell'AIE.

RISULTATI

Su un totale di 1552 campioni pervenuti al CRAIE per la conferma diagnostica, 243 sono stati esaminati con tutte e tre le metodiche (C-ELISA/AGID/IB). I positivi confermati dal CRAIE nel periodo 2009-2011 sono stati complessivamente 814.

Dei 243 con esito discordante esaminati in IB, 43 campioni negativi in AGID sono risultati positivi all'IB, pari al 5,3% del

totale (43/814). In tabella 1 sono illustrati gli esiti dei campioni saggiati in IB.

Analizzando in dettaglio la reattività dei campioni testati in IB (tabella 2), possiamo osservare come 36 dei 43 campioni dubbi/positivi ELISA non confermati in AGID (84%) presentino reattività verso tutte e tre le proteine virali (p26, gp45 e gp90). Tra i campioni con esito discordante non confermati, 8 mostrano positività per la p26 e la gp90 ma sono stati considerati negativi perché con reattività inferiore al controllo interno positivo. I pattern di reattività non riportati non sono stati osservati negli esami effettuati.

Tabella 1: esiti dei campioni testati in IB

Reattività dei campioni esaminati in IB	2009	2010	2011*	TOT
CElisa pos/AGID neg /IB pos	23	14	2	39
CElisa pos/AGID neg /IB neg	35	45	44	124
CElisa dubbio/AGID neg /IB pos	1	3	0	4
CElisa dubbio/AGID neg /IB neg	14	35	27	76
TOTALE	73	97	73	243

*dati aggiornati al 31.08.2011

Tabella 2: pattern di reattività dei campioni esaminati in IB

Reattività dei campioni esaminati in IB	p26	p26 +gp90	p26 +gp45 +gp90	TOT
CElisa pos/AGID neg/ IB pos	0	3	36	39
CElisa dubbio/AGIDneg/ IB pos	0	4	0	4
CElisa pos/AGID neg/ IB neg	46	5*	0	51
CElisa dubbio/AGID neg/ IB neg	24	3*	0	27
TOTALE	70	15	36	121

*campioni considerati negativi in IB perché con reattività inferiore al controllo positivo

Utilizzando l'IB come metodo di conferma, è stato possibile recuperare il 5,6 % dei positivi totali.

DISCUSSIONE

L'applicazione di un nuovo iter diagnostico, con screening dei campioni in ELISA ed esame in IB dei sieri non confermati in AGID, ha permesso di rintracciare delle positività altrimenti non rilevate.

Sebbene con percentuali inferiori, i dati ottenuti confermano quanto già osservato da Scicluna *et al.* nel 2008, in primo luogo per il trend negativo della prevalenza complessiva, poi perché il dato del 2008 derivava da un'area endemica per la malattia, caratterizzata da un tasso di prevalenza relativamente elevato rispetto al contesto nazionale.

L'elevata sensibilità dell'ELISA, che ha permesso il riscontro di positivi non rilevati in AGID, ne giustifica l'impiego in fase iniziale di screening. Nonostante sia stata più volte rappresentata la

necessità di impiegare un metodo di screening più sensibile e di oggettiva interpretazione, l'AGID resta il metodo principalmente usato per la diagnosi; questo è forse da ricollegare al numero limitato di campioni che soprattutto nelle sezioni periferiche non giustifica l'attivazione di sedute ELISA e complica la gestione dell'attività analitica. La sua adozione per lo screening iniziale consentirebbe di rilevare prima le positività e non tralasciare soggetti al limite della rilevabilità non facilmente diagnosticabili in AGID, elemento quanto mai importante nelle aziende sede di focolaio per limitare la possibilità di contagio e l'insorgenza di nuovi casi.

Il riscontro di positività in IB nei campioni con esito discordante ne giustifica l'utilità come test complementare per la conferma. L'IB consente di risolvere esiti di tipo inconclusivo, riducendo i tempi di chiusura dei focolai e limita la persistenza nel territorio di soggetti AGID negativi ma infetti, possibile fonte di diffusione dell'infezione. L'introduzione dell'IB permette anche di individuare i campioni reattivi solo per la p26 per probabili reazioni crociate con altri lentivirus.

L'applicazione dello schema diagnostico illustrato, con impiego dell'ELISA in tutti laboratori che eseguono lo screening iniziale prima di trasferire al CRAIE i campioni dubbi o positivi per la conferma in AGID e se necessario in IB, consentirebbe di rilevare prima le positività e di non tralasciare positivi non diagnosticati in AGID per una ridotta sensibilità.

L'impiego delle tecniche molecolari è ancora oggi limitato a causa della mancanza di metodi in grado di riconoscere la maggior parte degli stipti circolanti. Tuttavia possono costituire in alcuni casi uno strumento da affiancare alle tecniche sierologiche tradizionali.

Non si comprende come, ancora oggi, le autorità competenti non abbiano fornito indicazioni circa i citati protocolli diagnostici, a fronte della revisione dei documenti tecnici e normativi e delle reiterate informazioni scientifiche che il CRAIE ha documentato a supporto.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Burki, F. *et al.*, 1992. *Equine lentivirus, comparative studie on four serological test for the diagnosis of equine infectious anemia*. Vet. Microbiol. 33, pp 353-360.
- 2) Ciabatti I.M. *et al.*, 2000. *Expression of a recombinant p26 capsid protein of equine infectious anemia virus and use in the agar gel immunodiffusion test*. Proceedings of the 5th International Congress of the European Society for Veterinary Virology
- 3) <http://www.uky.edu/Ag/VetScience/EIA/hottopics.html#labsystem>
- 4) Issel, C.J. *et al.*, 1988. *Evolution of equine infectious anemia diagnostic tests: recognition of a need for detection of anti-EIAV glycoprotein antibodies*. In D.G. Powell (Editor), Proc. 5th Int. Conf. Eq. Inf. Dis. Univ. Press of Kentucky, Lexington, KY, pp. 196-200.
- 5) Issel, C.J. *et al.*, 1993. *A review of techniques for the serological diagnosis of equine infectious anemia*. J Vet. Diagn. Invest. ; 5 : pp 137-141.
- 6) Leroux C. *et al.*, 2004. *Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us?* Vet. Res. 35 (2004) 485-512.
- 7) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2008 Part 2 Section 2.5 Chapter 2.5.6 pagg. 866-870
- 8) Scicluna M.T. *et al.*, 2008. *Equine Infectious Anemia: should the agar immunodiffusion test still be used for screening and as unique confirmatory test?* X Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. - Alghero, 22-24 Ottobre 2008; Atti: pagg.78-79.

CONSIDERAZIONI SUL TREND DEI RISULTATI DEI CIRCUITI INTERLABORATORIO PER LA DIAGNOSI DI ANEMIA INFETTIVA DEGLI EQUINI CONDOTTI NEL CORSO DEGLI ULTIMI 9 ANNI

Ricci L.¹, Gasperetti L.¹, D'Alonzo A.¹, Nardini R.¹, Giusti C.¹, Forletta R.¹

¹Centro Referenza per l'Anemia infettiva degli equini, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Sezione di Pisa

Keywords: Interlaboratory comparison, equine infectious anemia, agar gel immunodiffusion

ABSTRACT

An inter-laboratory proficiency test for Agar Gel Immunodiffusion (AGID) used for the detection of Equine Infectious Anemia (EIA) antibodies in equids has been coordinated by the National Reference Centre (NRC) since 2002 to the present, with a growing number of participating labs. Over the period 2006-2010, 65 laboratories participated performing one or both methods prescribed for AGID, Coggins test and technique recommended by the OIE Manual. Data analysis shows a progressive improvement of the individual technical capacity of the lab, demonstrated by an increase of accordance to expected results; the interlaboratory comparison also highlights an achievement of a very good repeatability and reproducibility for AGID. Interlaboratory comparison is an important instrument used to verify technical capacity of labs and allows to identify and resolve problems in the method execution, essential in maintaining high quality standards for laboratory accreditation.

INTRODUZIONE

In base a quanto previsto dal D.M. 4/10/1999, il Centro di Referenza Nazionale per l'Anemia Infettiva Equina (CRAIE) organizza annualmente dal 2002 un Circuito Interlaboratorio (CI) per valutare la competenza tecnica dei singoli laboratori nell'AGID impiegata per la diagnosi di Anemia Infettiva Equina (AIE), soprattutto in riferimento alla possibile presenza di sieri debolmente positivi di difficile interpretazione. Parallelamente al CI organizzato, il CRAIE ha partecipato con continuità dal 2002 con esito sempre favorevole a prove di confronto interlaboratorio organizzate a livello europeo.

Il CI prevede l'esecuzione di prove o misurazioni specifiche in condizioni operative simili per tutti i laboratori partecipanti, che vengono verificati al fine di valutare la performance diagnostica individuale (3; 6; 7). Soltanto la soddisfacente partecipazione al CI, con l'adozione delle eventuali azioni correttive previste qualora emergano delle criticità, consente di mantenere gli standard qualitativi richiesti per le prove accreditate (1; 3; 6).

Il CI organizzato dal CRAIE ha raccolto un'adesione crescente da parte dei laboratori autorizzati, passando da 18 del 2002 a 72 nel 2004, valore che si è mantenuto più o meno costante negli anni successivi. Fino al 2005, il CI ha previsto soltanto l'esecuzione del test di Coggins, che dal 2006 fino al 2010 è stato sempre associato alla tecnica AGID descritta nel Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals OIE (Manuale OIE) (5). L'AGID eseguita con metodo OIE impiega un unico strato di agar invece del doppio strato previsto dal test di Coggins, che facilita la preparazione del terreno, e anticipa la lettura da 48 a 24 ore, riducendo i tempi della prova; questo metodo ha affiancato e sostituito nel tempo, il test di Coggins in molti laboratori.

Dei laboratori partecipanti, 65 hanno sempre aderito al CI eseguendo una o entrambe le tecniche.

Il presente contributo vuole illustrare i risultati ottenuti negli anni 2006-2010, più facilmente comparabili, anche in rapporto alla situazione precedente.

MATERIALI E METODI

Dal 2006 al 2010 hanno partecipato al CI 65 laboratori distribuiti tra Sedi e Sezioni degli I.I.ZZ.SS., oltre al Laboratorio di Igiene Ambientale di San Marino ed il Centro Studi e Ricerche di Sanità e Veterinaria di Roma. Il pannello distribuito ai singoli laboratori comprendeva ogni anno n°10 sieri di cui 7 positivi a diverso grado di positività, e 3 negativi; soltanto nel 2008 i sieri positivi erano 8 ed i negativi 2.

I sieri selezionati per il circuito sono allestiti a partire da sieri equini di collezione positivi e negativi all'AGID, nonché sieri di riferimento, disponibili presso il CRAIE; quelli positivi possono essere diluiti in siero negativo per ottenere sieri a diverso grado di positività. I sieri da distribuire sono sottoposti preventivamente a prove di omogeneità e stabilità (2) al fine di garantire l'uniformità dei misurandi per l'esecuzione delle verifiche di ripetibilità e riproducibilità delle prove effettuate. Il kit diagnostico impiegato è validato dal CRAIE come previsto dal D.M. 4/10/1999.

La valutazione statistica dei risultati è effettuata utilizzando il kappa (K) singolo per stimare il grado di accordo tra i risultati ottenuti dal singolo laboratorio e quelli attesi; per valutare invece il grado di accordo complessivo dei laboratori partecipanti, in riferimento alle metodiche eseguite è impiegato il K multiplo (4). Il K permette di valutare la concordanza degli esiti eliminando la componente attribuibile semplicemente all'effetto del caso. Il massimo grado di accordo possibile si ha quando K assume il valore di 1.

Per l'interpretazione del valore di K, viene utilizzata la tabella di valutazione di Altman di seguito riportata (Tabella 1):

Tabella 1: tabella di valutazione di Altman

VALORE DI K	Grado di accordo
<0,20	scarso
0,21- 0,40	mediocre
0,42 - 0,60	medio
0,61- 0,80	buono
0,81- 1	Molto buono

RISULTATI

Dei 65 laboratori, che hanno sempre partecipato al CI tra il 2006 ed il 2010, 27 hanno sempre ottenuto un K singolo pari ad 1. In tabella 2, è riportata la distribuzione dei laboratori negli anni in funzione della classificazione di Altman.

Tabella 2: valori di K singolo ottenuti

		ANNO				
		2006	2007	2008	2009	2010
VALORE DI K	0,21- 0,40	8	1	2	1	0
	0,42 - 0,60	5	0	0	0	1
	0,61- 0,80	7	2	0	2	1
	0,81- 1	45	62	63	62	63

I campioni non correttamente identificati da laboratori con $K < 1$, sono quasi esclusivamente attribuibili a sieri debolmente positivi, di difficile lettura: il 76% (64/84) con il test di Coggins e l'82% (47/57) con l'AGID metodo OIE in tutto il periodo considerato. Considerando il totale dei campioni positivi esaminati, non sono stati correttamente individuati il 7,6 % dei sieri debolmente positivi ed il 1,4 % dei sieri chiaramente positivi; in tabella 3 vengono riportate in dettaglio le percentuali di errore in riferimento alle due metodiche impiegate. Il riscontro occasionale di campioni negativi non identificati correttamente è da collegare a probabili errori di trascrizione degli esiti.

Tabella 3: percentuali di errore per i campioni positivi

	COGGINS	OIE
% PD errati/P totali	4,3	3,3
% P errati/P totali	0,9	0,5
TOTALE	5,2	3,8

L'elaborazione del K multiplo per valutare il grado di accordo ottenuto complessivamente dai laboratori partecipanti nei singoli anni è riportata di seguito in tabella 4.

Per i laboratori che hanno eseguito entrambe le metodiche, i risultati ottenuti con le due tecniche sono sempre sovrapponibili.

Tabella 4: valori di K multiplo ottenuti anni 2006-2010

ANNO	2006	2007	2008	2009	2010
AGID Coggins	0,78	0,94	1	0,94	0,95
AGID OIE	0,77	0,98	1	0,97	0,98

DISCUSSIONE

Il numero costantemente elevato di laboratori che ha aderito al CI negli anni ne dimostra l'utilità e l'importanza per il mantenimento degli standard qualitativi richiesti dall'accreditamento. Inoltre, elemento di maggior rilievo, la verifica delle performances diagnostiche individuali e complessive, è indispensabile ai fini della valutazione dell'efficienza del sistema diagnostico nazionale anche in relazione al Piano di Controllo dell'AIE.

Il mantenimento di adeguati livelli tecnici di esecuzione, monitorati su base continua attraverso il CI, fornisce garanzia di diagnosi.

L'introduzione dell'AGID con la metodica OIE nel CI ha permesso una verifica costante nei laboratori di prova, che in numero sempre maggiore l'hanno adottata, affiancandola e in molti casi sostituendola al test di Coggins, con una conseguente riduzione dei tempi di esecuzione e risparmio in termini di reagenti.

Il numero crescente dei laboratori con K singolo $\geq 0,8$ e grado di accordo "molto buono" evidenzia il complessivo miglioramento delle performances diagnostiche individuali.

Di conseguenza, anche l'elaborazione del K multiplo dimostra il raggiungimento complessivo di elevati standard qualitativi. Il mantenimento di valori molto prossimi all'1, ovvero del massimo grado di accordo possibile, testimoniano la stabilità dei due metodi di prova con ottimi livelli di ripetibilità e riproducibilità per il test di Coggins ma ancora di più per la tecnica OIE.

Il miglioramento globale ottenuto si evince anche comparando i risultati del periodo 2006-2010 a quello degli anni precedenti riportato in tabella 5, che accentuano l'incremento totale del

valore di K. Il minor grado di accordo raggiunto nel 2006 è verosimilmente associabile all'introduzione nel pannello di sieri positivi di più difficile interpretazione al limite della rilevanza. Questo alla luce dei focolai riscontrati nello stesso anno nel territorio nazionale, che hanno reso necessaria una maggiore attenzione nei confronti di tali campioni, anche in funzione dell'imminenza dell'attuazione del Piano Nazionale di Controllo.

Tabella 5: valori di K multiplo ottenuti anni 2002-2005

ANNO	2002	2003	2004	2005
AGID Coggins	0,74	0,87	0,96	0,92

Nell'AIE, a differenza di altre patologie come la Leucosi Bovina, è frequente il riscontro di reattività al limite, come ampiamente descritto in bibliografia. Si sottolinea che nel corso della diagnostica corrente, la percentuale di errore sui sieri debolmente positivi potrebbe essere superiore rispetto a quella osservata nel corso del CI, in quanto l'attenzione posta in corso di lettura dei risultati rispetto ad una prova valutativa interlaboratorio è certamente superiore.

La mancata identificazione di una discreta percentuale di sieri debolmente positivi rende pertanto necessaria l'introduzione di tecniche di screening più sensibili e di oggettiva lettura al fine di reclutare il maggior numero di soggetti positivi ed aumentare l'efficacia delle azioni di sorveglianza. L'introduzione dell'ELISA, impiegato in misura sempre maggiore come test di screening, grazie alle caratteristiche di elevata sensibilità, rapidità di esecuzione ed oggettività del test, potrebbe costituire uno strumento di verifica utile per i laboratori che eseguono la prova. Un altro importante elemento che emerge dai dati raccolti, è che i minori gradi di concordanza sono stati osservati in laboratori che esaminano un modesto numero di campioni, rimarcando il ruolo fondamentale dell'esperienza nell'esecuzione di queste prove. Pertanto, è auspicabile che gli Istituti effettuino delle scelte organizzative, concentrando la diagnostica specifica presso strutture che effettuano livelli di attività più consistenti. L'importanza dell'esperienza nella corretta esecuzione e lettura del test è dimostrata anche dai risultati ottenuti a livello europeo, con prestazioni nazionali migliori degli altri Paesi, probabilmente proprio per l'attività svolta negli ultimi anni, che ha migliorato in termini generali le capacità tecniche individuali e complessive relativamente ai metodi impiegati per la diagnosi di AIE.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ACCREDIA, 2010. PROVE VALUTATIVE in REGOLAMENTI TECNICI RT-24 rev. 01
- 2) Guidelines OIE 1998. Guidelines of the Office International des Epizooties for laboratory quality evaluation, for international reference standards for antibody assays and for laboratory proficiency testing. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 17 (2), 600-609
- 3) <http://www.oie.int/our-scientific-expertise/reference-laboratories/proficiency-testing/>
- 4) Langton S.D., Chevenement R., Nagelkerke N., Lombard B., 2002. Analysing collaborative trials for qualitative microbiological methods: concordance and concordance. International Journal of Food Microbiology 79: pp. 175-181
- 5) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2008 Part 2 Section 2.5 Chapter 2.5.6 pagg. 866-870
- 6) UNI CEI EN ISO/IEC 17025 par. 5.9
- 7) UNI CEI EN ISO/IEC 17043 par. 3.4

SU DI UN EPISODIO DI RED MARK SYNDROME IN TROTA IRIDEA (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) IN PIEMONTE: DESCRIZIONE DEL QUADRO ANATOMOPATOLOGICO ED ISTOLOGICO

Righetti M., Bozzetta E., Pezzolato M., Arsieni P., Varello K., Saragaglia C., Di Donfrancesco B., Pavoletti E., Prearo M.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino.

Key words: Red Mark Syndrome, Trota iridea, Reperti anatomoistopatologici.

INTRODUZIONE

La Red Mark Syndrome (RMS) o Cold Water Strawberry Disease è una patologia cutanea ad eziologia incerta che colpisce la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) d'allevamento. Descritta per la prima volta negli anni 2003-2004 in Scozia, si è successivamente diffusa in tutto il territorio inglese ed in seguito anche nel continente Europeo e negli Stati Uniti (2; 5; 7). E' una patologia che si presenta in Salmonidi allevati in acque fredde e si differenzia dalla Strawberry Disease o Warm Water Strawberry Disease tipica di acque più calde: entrambe le patologie presentano un quadro sintomatologico simile, ma sono ritenute da numerosi autori, due malattie distinte (7). È stato ipotizzato da più autori il coinvolgimento di un agente infettivo, in quanto la malattia sembra essere trasmissibile; inoltre, l'esperienza condotta su campo suggerisce che tale agente possa essere di natura batterica (7), in quanto risponde ai trattamenti antibiotici. Alcuni autori hanno isolato da soggetti colpiti da RMS, *Flavobacterium psychrophilum*, confermandone la presenza anche tramite metodiche di biologia molecolare su cute colpita (2; 7; 8). Tuttavia, allo stato attuale delle conoscenze, la RMS viene considerata una malattia multifattoriale, in cui più volte è stato associato il ritrovamento di un organismo *Rickettsia*-like (4; 5).

L'impatto che tale patologia riveste sull'acquacoltura britannica è molto significativo (7); la malattia si verifica quando la temperatura dell'acqua è inferiore ai 15°C e i pesci colpiti non sembrano manifestare sofferenza, in quanto si alimentano e crescono normalmente. La mortalità è generalmente molto bassa, anche se un gran numero di soggetti può essere colpito. Il problema principale di tale patologia è dato dal declassamento dello stock per la presenza delle lesioni cutanee, con conseguenti perdite economiche anche rilevanti (6; 7).

Negli ultimi due anni sono stati segnalati alcuni casi di RMS anche sul territorio nazionale (1; 3), ma allo stato attuale delle conoscenze, non è possibile disegnare la sua esatta distribuzione nelle trote coltivate italiane e soprattutto quantificare le perdite economiche che causa.

Scopo del presente lavoro è quello di descrivere un episodio di RMS evidenziato durante una gara di pesca sportiva sul territorio piemontese.

MATERIALI E METODI

Nella tarda primavera 2010 sono giunti al laboratorio di Torino, 27 esemplari di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) con evidenti arrossamenti cutanei, provenienti da una partita costituita da circa 800 soggetti immessa a scopo di pesca sportiva in una riserva privata dell'alto cuneese. Durante tale gara le trote immesse sono state tutte pescate e solamente i 27 esemplari poi conferiti in laboratorio sono risultati colpiti da queste manifestazioni.

Su tutti gli esemplari, sono state effettuate le indagini routinarie di laboratorio, per evidenziare la possibile causa di tale patologia; è stato condotto un esame anatomopatologico per

evidenziare le lesioni macroscopicamente visibili sui soggetti; è stato poi effettuato un esame parassitologico a carico di cute e branchie e degli organi interni. L'esame colturale, eseguito mediante prelievo da rene, milza e fegato, è stato effettuato su terreni di primo isolamento (Agar sangue e Trypton Soy Agar). È stato effettuato inoltre un prelievo di milza, rene, cuore e cervello per le indagini virologiche; tali organi sono stati prelevati e omogeneizzati per ogni singolo pesce. Gli omogenati ottenuti sono stati centrifugati e i surnatanti sono stati inoculati su piastre a 24 pozzetti con monostrati cellulari specifici (EPC e BF2). Infine, alcune porzioni di cute e muscolo con lesioni evidenti sono state fissate in formalina tamponata ed avviate alle indagini istologiche. I campioni sono stati poi processati ed inclusi in paraffina; sono stati allestiti vetrini con sezioni di 4-5 µm dei preparati e colorati con Ematossilina-Eosina.

Alcuni giorni dopo, l'allevatore che aveva fornito agli organizzatori della gara, la partita di trote analizzate, sollecitato dal cliente stesso, si è messo in contatto con il laboratorio per verificare lo stato di salute dell'intera partita da cui provenivano i pesci della fornitura. Sono state campionate ulteriori 30 trote iridea, tutte con manifestazioni cutanee più o meno evidenti e sottoposte a tutte le analisi precedentemente descritte.

RISULTATI

Il quadro anatomopatologico dei 27 esemplari giunti in laboratorio, era caratterizzato da un'evidente ipermucosità branchiale e dalla presenza di emorragie cutanee più o meno estese, localizzate soprattutto a livello di fianchi; in alcuni esemplari si osservava la presenza di piccole lesioni ulcerative cutanee con interessamento parziale del tessuto muscolare (Figura 1).

Figura 1 – Presenza di emorragie cutanee localizzate sul fianco di trota iridea (evidenziata nel cerchio).



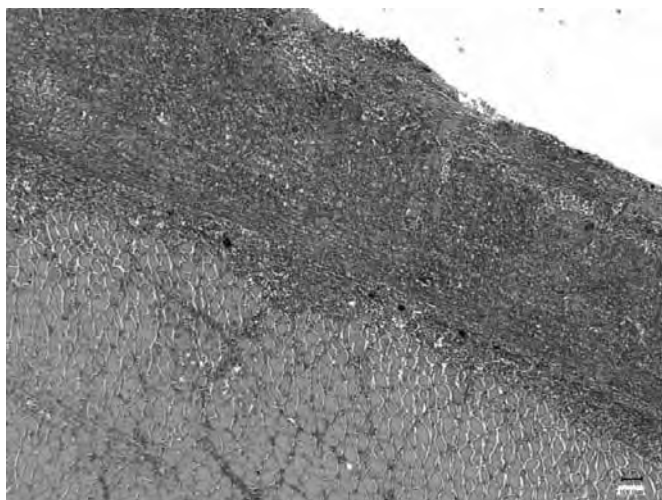
All'apertura della cavità addominale, alcuni soggetti presentavano splenomegalia, emorragie epatiche, del grasso periviscerale e della vescica natatoria.

L'esame colturale ha permesso di isolare solamente da tre soggetti *Aeromonas salmonicida*, agente eziologico della foruncolosi, mentre nei restanti 24 pesci, è risultato negativo.

Gli esami parassitologici e virologici sono risultati negativi per tutti i soggetti.

Il quadro istologico evidenziato nelle lesioni cutanee era caratterizzato da erosioni dell'epidermide, associate a imponente e grave infiltrazione di cellule mononucleate e fibrosi in estensione al derma e alle fibre muscolari sottostanti (Figura 2).

Figura 2 – Infiltrazione di cellule mononucleate con fibrosi in estensione al derma ed alle fibre muscolari sottostanti.



Nel secondo gruppo di trote analizzate, il quadro anatomopatologico è risultato il medesimo descritto precedentemente, con una gradazione molto diversificata delle lesioni, che andava da un semplice arrossamento della cute, generalmente a livello ventrale, alla presenza di emorragie estese e piccole ulcerazioni della cute. Nella partita colpita non si è evidenziata alcuna mortalità e i pesci interessati dalla sintomatologia erano in numero ridotto; inoltre con l'anamnesi fornita dal proprietario, si è potuto stabilire che la temperatura dell'acqua in quel periodo era di circa 13,5°C. Da tutti questi esemplari, l'esame colturale è risultato negativo, così come l'esame parassitologico e virologico. Il quadro istologico riscontrato è stato del tutto sovrapponibile a quello osservato nel primo campionamento, con una maggiore gradazione della gravità.

DISCUSSIONE

La prevalenza dei soggetti colpiti da questa sindrome nel lotto di 800 pesci del primo episodio è molto bassa (3,4%). Nell'allevamento è invece risultato piuttosto difficile quantificare l'episodio, in quanto in vasca era praticamente impossibile vedere le lesioni: si evidenziavano solamente con il prelievo del pesce. Inoltre non è stata riscontrata mortalità riconducibile al quadro descritto nell'intera partita. La morbidità osservata in questo doppio episodio, appare in linea a quanto descritto da altri autori sul territorio nazionale (1; 3).

La presenza in tre pesci del primo campionamento di *A. salmonicida*, non esclude il quadro che si è riscontrato in tutte le altre trote analizzate. Il reperto istopatologico osservato in tutti i soggetti, è riferibile a grave e diffusa dermatite lichenoidale. Dai risultati istologici, le lesioni sono apparse compatibili con quelle

descritte in letteratura della RMS (3; 4; 5; 6; 7); questo episodio rappresenta perciò la prima segnalazione di Red Mark Syndrome sul territorio piemontese.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Cervellione F., Salogni C., Mioso P.M., Alborali G.L. & Gelmetti D. (2011). Red Mark Syndrome nella trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) allevata nel Nord Italia: descrizione anatomopatologica, istologica ed indagine eziologica. *Atti del XVII Congresso Nazionale S.I.P.I., Ostuni (BR)*, 19-21 maggio 2011: 46.
- 2) Ferguson H.W., Girons A., Rizgalla G., LaPatra S., Branson E.J., Mackenzie K., Davies M., Collins R.O., Diab A. & Crumlish M. (2006). Strawberry disease in rainbow trout in Scotland: pathology and association with *Flavobacterium psychrophilum*. *Vet. Rec.*, 158: 630-631.
- 3) Galeotti M., Giavenni R., Volpatti D., Beraldo P. & Feist S.W. (2011). Inquadramento anatomoistopatologico di lesioni riferibili a Red Mark Syndrome/Strawberry Disease in trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*). *Atti del XVII Congresso Nazionale S.I.P.I., Ostuni (BR)*, 19-21 maggio 2011: 26.
- 4) Lloyd S.J., LaPatra S.E., Snekvik K.R., St-Hilaire S., Cain K.D. & Call D.R. (2008). Strawberry disease lesions in rainbow trout from southern Idaho are associated with DNA from a *Rickettsia*-like organism. *Dis. Aquat. Org.*, 82: 11-118.
- 5) Metselaar M., Thompson K.D., Gratacap R.M., Kik M.J., LaPatra S.E., Lloyd S.J., Call D.R., Smith P.D. & Adams A. (2010). Association of red-mark syndrome with a *Rickettsia*-like organism and its connection with strawberry disease in the USA. *J. Fish Dis.*, 33, 10: 849-858.
- 6) Schmidt-Posthaus H., Bergmann W., Knüsel R., Heistering H. & Licek E. (2009). Appearance of red mark syndrome/cold water strawberry disease in Switzerland and Austria. *Dis. Aquat. Org.*, 88, 1: 65-68.
- 7) Verner-Jeffreys D.W., Pond M.J., Peeler E.J., Rimmer G.S.E., Oidtmann B., Way K., Mewett J., Jeffrey K., Bateman K., Reese R.A. & Feist S.W. (2007). Emergence of cold water strawberry disease of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in England and Wales: outbreak investigations and transmission studies. *Dis Aquat. Org.*, 79, 3: 207-218.
- 8) Wallis T., Dalsgaard I., Hopewell R. & Kardos G. (2009). The potential of autogenous vaccines based on *Flavobacterium psychrophilum* for the control of Rainbow Trout Fry Syndrome and Red Mark Syndrome in salmonids: typing of *F. psychrophilum* isolates from salmon and trout in the UK. *Proceedings 2^{ème} Conférence sur le bactéries du genre Flavobacterium, Flavobacterium 2009; Paris, September, 21-23, 2009.*

SUMMARY

The Red Mark Syndrome (RMS) is a disease of uncertain etiology that affects the skin in farming rainbow trout. A case highlighted in the spring of 2010, with a prevalence of 3.4% is described, where the pathological and histological picture is consistent with those mentioned in the literature. It showed haemorrhages of the skin more or less extensive, localized mainly at the hips; histologically it showed erosions of the epidermis, associated with massive and severe infiltration of mononuclear cells and fibrosis in the dermis and extending to the underlying muscle fibers.

ANALISI FILOGENETICA DI AVIPOXVIRUS ISOLATI IN PIEMONTE, LIGURIA E VALLE D'AOSTA A PARTIRE DAL 2006

Rizzo F.¹, Potenza M.¹, Belvedere M.¹, Ameri D.¹, Bianchi C.⁴, Robetto S.², Peletto S.³, Orusa R.², Mandola M. L.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (IZS PLV), S.S. Lab Spec Diagnostica Molecolare Virologica e Ovocoltura, Torino, Italia ²IZS PLV con Annesso Ce.R.M.A.S. (Centro di Referenza Nazionale per le Malattie degli Animali Selvatici), Quart, Aosta, Italia; ³IZS PLV, Dipartimento di Neuroscienze Centro di Referenza per TSE; ⁴IZS PLV, Sezione di Cuneo

Key words: Avipoxvirus, analisi filogenetica, avifauna

SUMMARY

Genetic characterization of *Avipoxvirus* strains isolated from wild and domestic avian species in North West Italy from 2006 to 2010, has been achieved in this study. PCR and subsequent partial sequencing of the *Avipoxvirus* P4b core protein gene have been performed on DNA extracted from skin homogenates or chorioallantoic membranes (M.C.A.) of SPF embryonated chicken eggs. A Jukes Cantor model was used to construct a phylogenetic tree based on neighbor-joining method with 1000 bootstrap replicates. Phylogenetic analysis revealed that all the strains show a 100% similarity with sequences from Fowlpox and Pigeonpox viruses already present in GenBank and all belong to Clade A.

INTRODUZIONE

Il vaiolo aviario è una malattia virale a lenta evoluzione determinata da infezione da poxvirus aviari appartenenti alla famiglia *Poxviridae*, genere *Avipoxvirus* (APV); gli agenti virali responsabili sono altamente resistenti e in grado di sopravvivere per mesi nell'ambiente (1). La malattia si manifesta principalmente in due forme: una cutanea, definita secca, e una differica, umida. La forma cutanea è caratterizzata dalla comparsa di lesioni nodulari generalmente sulle parti del corpo prive di penne, mentre quella umida colpisce le mucose della cavità orale e del tratto respiratorio superiore (2). La virulenza del virus dipende da vari fattori tra i quali stress fisico e ambientale, stipite virale coinvolto, via d'infezione, presenza di coinfezioni e, inoltre, età e specie del volatile colpito (3). Negli ultimi anni APV è stato isolato in numerose specie di uccelli, sia domestici che selvatici, fatto che suggerisce una trasmissione interspecifica che troverebbe conferma nelle analisi filogenetiche basate sul gene della proteina 4b del core (4). All'interno del genere sono riconosciute, al momento, 10 specie (*Canarypox*, *Fowlpox*, *Juncopox*, *Mynahpox*, *Pigeonpox*, *Psittacinepox*, *Quailpox*, *Sparrowpox*, *Starlingpox*, *Turkeypox*) e ulteriori 3 specie sono in via di classificazione (5). Le infezioni da poxvirus aviario, causa di ingenti perdite economiche per l'industria del pollame, sono altresì coinvolte nella perdita di biodiversità all'interno delle popolazioni di avifauna native, come dimostrato alle Hawaii (6) e alle Galapagos (7). Ad oggi sono stati sequenziati interamente solo il genoma di un isolato di Fowlpoxvirus e quello di un Canarypoxvirus ed esistono poche informazioni sulla presenza e diffusione degli Avipoxvirus nell'avifauna selvatica (8).

MATERIALI E METODI

Un totale di 14 soggetti di avifauna selvatica e domestica, campionati in Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta a partire dal 2006 e risultati positivi all'isolamento su M.C.A. di uova embrionate di pollo SPF, conservati a -20°C, sono stati sottoposti ad analisi biomolecolari (Tab. 1). Il DNA è stato estratto da circa 30 mg di ciascun campione (prevalentemente

cute con lesioni o M.C.A.) utilizzando il QIAamp DNA mini kit – QIAGEN secondo le specifiche del kit, con eluizione finale in 150 µl di H₂O U.P. Rnase-DNase free. I campioni estratti, amplificati tramite PCR specifica per il gene della proteina P4b del core (9), sono stati sottoposti a sequenziamento parziale del locus.

Dopo allineamento delle sequenze (436 bp) con quelle di riferimento presenti in GenBank, grazie al software SeqMan (Lasergene), è stato costruito un albero filogenetico utilizzando il modello di Jukes Cantor, con il metodo Neighbour-Joining (1000 replicati di bootstrap) al fine di poter definire il clade di appartenenza di ogni isolato.

Tabella 1: Campioni analizzati

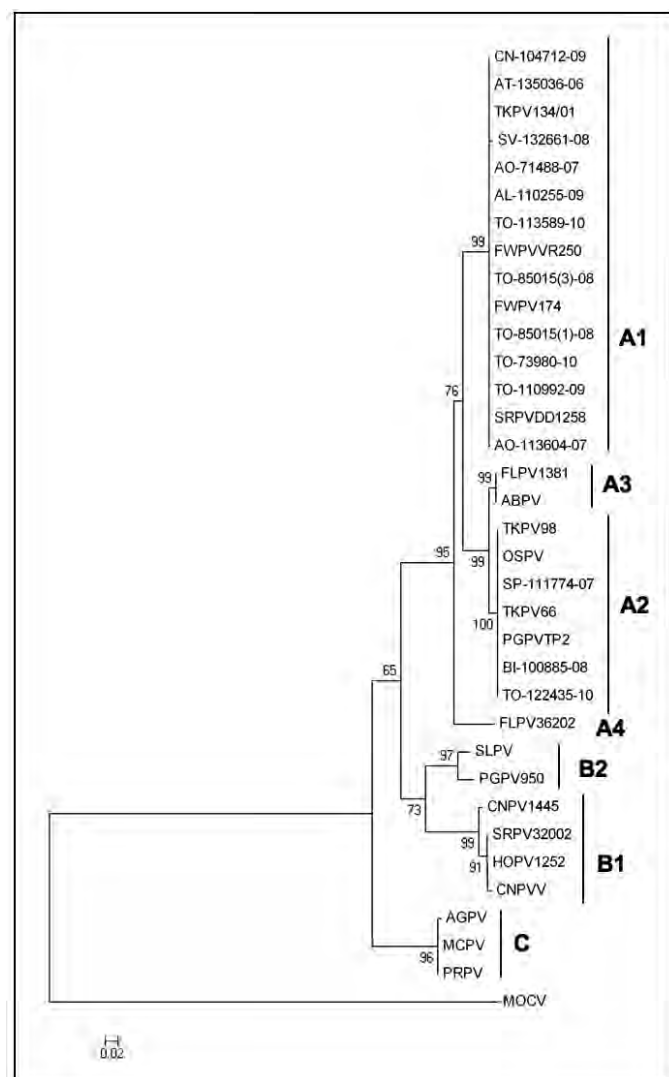
ID Campione	SPECIE	MATRICE	PROVINCIA
AT-135036-06	Pollo <i>Gallus gallus</i>	MCA	AT
AO-113604-07	Cornacchia <i>Corvus corone</i>	MCA	AO
SP-111774-07	Piccione <i>Columba livia</i>	MCA	SP
AO-71448-07	Pollo <i>Gallus gallus</i>	MCA	AO
BI-100885-08	Piccione <i>Columba livia</i>	CUTE	BI
SV-132661-08	Pollo <i>Gallus gallus</i>	CUTE	SV
TO-85015(1)-08	Cornacchia grigia <i>Corvus corone cornix</i>	MCA	TO
TO-85015(3)-08	Cornacchia grigia <i>Corvus corone cornix</i>	MCA	TO
AL-110255-09	Pollo <i>Gallus gallus</i>	MCA	AL
TO-110992-09	Canarino <i>Serinus canarius</i>	MCA	TO
CN-104712-09	Gallina <i>Gallus gallus</i>	CUTE	CN
TO-113589-10	Pollo <i>Gallus gallus</i>	PO-SNC	TO
TO-122435-10	Piccione <i>Columba livia</i>	CUTE	TO
TO-73980-10	Cardellino <i>Carduelis carduelis</i>	MCA	TO

RISULTATI

Da segnalare che da alcuni campioni di cute storici, a causa del deterioramento del tessuto di partenza, non è stato possibile estrarre il DNA; si è pertanto proceduto all'estrazione direttamente dalla M.C.A. di uova precedentemente inoculate,

che risultando positiva alla PCR per il gene P4b, ha consentito di ottenere la sequenza di interesse. La caratterizzazione filogenetica ha rivelato che tutti i ceppi analizzati presso l'IZS PLV hanno un'identità di sequenza pari al 100% rispetto a sequenze già registrate in GenBank e appartenenti al clade A (9-10). Nello specifico, l'albero filogenetico costruito per il gene della proteina 4b (Fig. 1) del core vede collocati all'interno della specie *Fowlpox* (subclade A1) 6 isolati da pollo, 1 da cornacchia, 2 da cornacchia grigia, 1 da cardellino e 1 da canarino, mentre all'interno della specie *Pigeonpox* (subclade A2) 3 isolati da colombo. Degna di nota è la presenza di un isolato da canarino compreso nel subclade A1 anziché nel B1 tipico dei *Canarypox*, come atteso

Fig. 1: Albero filogenetico del gene della proteina 4b



DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

Dal punto di vista diagnostico le infezioni da Avian Pox virus vengono rilevate su base clinica, anatomo-patologica e istologica e, solo in un secondo tempo, confermate con l'isolamento virale su uova embrionate. Tuttavia, in alcuni casi, è possibile che, pur in presenza di lesioni macroscopicamente

evidenti, non si riescano, ad evidenziare le classiche lesioni su M.C.A. Anche per tale ragione in questi ultimi anni, in aggiunta ai metodi classici di diagnosi, si fa sempre più spesso ricorso ai metodi biomolecolari. Il protocollo di PCR di screening (9), ha come target il gene della proteina P4b del core, sequenza più utilizzata attualmente per la filogenesi dei poxvirus aviari. Tale target genomico ha il vantaggio di permettere una valutazione diretta della distanza genetica dei ceppi virali nei confronti di sequenze di riferimento disponibili nei database pubblici, grazie al sequenziamento del medesimo amplicone ottenuto nella prima fase di screening.

La caratterizzazione filogenetica di isolati storici di APV risulta importante per tracciare lo sfondo epidemiologico di una determinata area; tuttavia, la sequenza della proteina P4b del core appare sempre più spesso un marcatore filogeneticamente insufficiente a spiegare la complessa tassonomia evolutiva di gruppi virali di queste dimensioni e diversità (10). Infatti numerosi autori concordano nel ritenere fondamentale l'acquisizione di sequenze geniche dal maggior numero di isolati, al fine di poter aggiungere nuove informazioni, rispetto alle ancora poche disponibili. Infine la definizione di altri loci genetici, al di là del gene P4b, permetterebbe una migliore risoluzione filogenetica, utile ad indagare le complesse relazioni esistenti tra gli Avian Poxvirus e i loro ospiti naturali (9).

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Calnek B.W. (2001). Vaiolo Aviare. In: *Patologia Aviaria*. X edizione. Piccin editore, Padova, p. 717
2. Birchard S.J., Sherding R.G. (2009). Medicina e chirurgia degli animali da compagnia. Manuale pratico. Elsevier srl, Cap.169, p. 1551
3. Tripathy, D.N. & Reed, W.M. (1997). Pox. In B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, R.L. Mc Dougald & Y.M. Saif (Eds.), *Diseases of Poultry* 10th edition, pp. 643–659. Ames, IA: Iowa State University Press.
4. Terasaki T., Kaneko M., and Mase M. (2010). Avian poxvirus infection in flamingos (*Phoenicopterus roseus*) in a zoo in Japan. *Avian Diseases*, 54 (2):955-7
5. <http://www.ictvdb.org/ictv/index.htm>
6. Jarvi S.I. Wel, S. C., Traavik T., Tryland M., Coucheron D.H., and Nilssen O. (2008). Diversity, origins and virulence of Avipoxviruses in Hawaiian forest birds. *Conservation Genetics*, 9 (2): 339-348
7. Thiel T., Whiteman N.K., Tirapé A., Baquero M.I., Cedeño V., Walsh T., Uzcátegui G.J., and Parke P.G. (2005). Characterization of canarypox-like viruses infecting endemic birds in the Galápagos Islands. *Journal of Wildlife Diseases*, 41(2):342-353
8. Afonso C.L., Tulman E.R., Lu Z., Zsak L., Kutish G.F., and D. L. Rock (2000). The genome of Fowlpox virus. *Journal of Virology*, 74(8): 3815-3831
9. Manarolla G., Pisoni G., Sironi G., and Tiziana Rampin (2010). Molecular biological characterization of avian poxvirus strains isolated from different avian species. *Veterinary Microbiology*, 140 (1-2):1-8
10. Jarmin S., Manvell R., Gough R.E., Laidaw S.M., Skinner M.A. (2006). Avipoxvirus phylogenetics: identification of a PCR length polymorphism that discriminates between the two major clades. *Journal of General Virology*, 87(8): 2191-220

ESPRESSIONE DELLA GP51 INTERA E MUTATA DEL VIRUS DELLA LEUCOSI ENZOOTICA BOVINA IN CELLULE DI MAMMIFERO E VALUTAZIONE DI UN SUO IMPIEGO IN ELISA

Rizzo G., Forti K., Cagiola M., Feliziani F., Ferrante G., De Giuseppe A.

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

Key words: CHO-S, BHK-21, BLV

SUMMARY

This work reports the expression of entire (gp51) and mutant (gp51_{C/A-179/182}) form of gp51 of BLV in Chinese Hamster Ovary (CHO-S) and Baby Hamster Kidney (BHK-21) cell lines. Western blot analysis evidenced that the recombinant proteins present a molecular weight higher than gp51 produced in Foetal Lamb Kidney (gp51-FLK) or baculovirus system. The conformational structure was not compromised. Preliminary studies showed that the recombinant proteins may be used in a competitive ELISA with a higher sensibility than the previously antigen produced in baculovirus system.

INTRODUZIONE

Il virus della Leucosi Bovina (BLV) è un retrovirus oncogeno di tipo C ed è strettamente relato ai virus T-linfotropici umani HTLV 1-4 (1). Il BLV è l'agente eziologico della Leucosi Enzoetica Bovina, una malattia che causa una linfocitosi persistente caratterizzata da un'espansione policlonale benigna dei linfociti B. In alcuni casi (<5%) gli animali infettati dal BLV sviluppano un linfosarcoma maligno (2). Il genoma del BLV è rappresentato da un trascritto di RNA approssimativamente 9 kb il quale include i geni *gag-pol-env*, richiesti per la sintesi delle particelle virali (3). Le glicoproteine dell'*envelope* sono sintetizzate in un unico precursore polipeptidico di 72 kDa, il quale subisce modificazioni post-traslazionali ad opera delle proteasi cellulari. Tali digestioni enzimatiche danno origine alla glicoproteina gp30, una proteina transmembranaria (TM) e alla glicoproteina gp51 cioè una proteina associata alla superficie (SU) entrambe unite tra di loro mediante un ponte disolfuro. La maggior parte degli animali infettati con il BLV sviluppano una forte e permanente risposta anticorpale verso la proteina gp51. Una precoce evidenziazione degli anticorpi anti-gp51 rappresenta un'efficiente via per il controllo ed eradicazione della malattia. Recentemente la gp51 e alcune forme delete della stessa, sono state espresse in sistema baculovirus, purificate ed impiegate per l'allestimento di un kit ELISA *homemade* di tipo sandwich con un netto miglioramento delle *performances* di specificità e sensibilità (4, 5). Risultati analoghi non sono stati ottenuti utilizzando un test di tipo competitivo, in quanto la sensibilità osservata è rimasta significativamente inferiore a quella dei kit ELISA commerciali. Il presente studio riporta l'espressione della gp51 e di una sua forma mutata in cellule CHO-S e BHK-21. Le proteine sintetizzate sono state caratterizzate e testate in un saggio ELISA di tipo competitivo.

MATERIALI E METODI

Mutagenesi sito specifica: le mutazioni delle Cisteine localizzate in posizione 179 e 182 nella sequenza ammino-acidica della gp51 (con esclusione dei 33 ammino-acidi della *signal sequence*), sono state eseguite mediante l'impiego di due coppie di oligonucleotidi in due differenti steps di PCR. Nel primo ciclo di amplificazione il primer forward (gp51Nde-F) 5'-agggccatggtcacatatg-3' (comprendente il sito di restrizione NdeI) e il primer reverse 5'-ccaagctatagcagcgtctggaag-3', nonché l'oligonucleotide forward 5'-ccagacgctgctatagcttggaacc-3' e il corrispettivo reverse (gp51 Age-R) 5'-ccgctcaaccggtacgtctgaccgggtag-3'

(comprendente il sito di restrizione AgeI) sono stati utilizzati per l'amplificazione rispettivamente delle regioni nucleotidiche 5127-5468 e 5447-5723 della gp51. I due inserti sono stati purificati e sottoposti in quantità equimolecolare ad un secondo step di PCR con i primers gp51Nde-F e gp51 Age-R. L'amplicone ottenuto è stato a sua volta purificato, quantificato ed impiegato nelle procedure di clonaggio.

Clonaggio: il gene codificante per la gp51 intera, *in frame* all'estremità C-terminale con un tag di poli-Istina, è stato ottenuto mediante taglio con l'enzima di restrizione EcoRI dal costrutto gp51-His/pFastBac1 precedentemente preparato per altri studi e purificato. L'amplicato sopra descritto è stato digerito con gli enzimi di restrizione NdeI ed AgeI e clonato nel costrutto gp51/pFastBac1, originando il plasmide contenente l'informazione genetica per la codifica della forma mutata della gp51 *in frame*. Infine, il costrutto è stato digerito con l'enzima EcoRI e l'inserto derivato è stato clonato nel vettore d'espressione eucariotico pcDNA3.1/Zeo- (Invitrogen).

Trasfezione: cellule CHO-S (Invitrogen), cresciute in sospensione in terreno privo di siero, sono state trasfettate con il FreeStyle Max Reagent. Le cellule BHK-21 cresciute in aderenza in terreno addizionato di siero fetale bovino (FBS) sono state trasfettate con il Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen). Aliquote di terreno sono state raccolte a 24, 48 e 72h post-trasfezione ed analizzate mediante un kit *homemade* ELISA (4).

Anticorpi monoclonali (Mabs): il Mab BLV2 (VMDB) in grado di riconoscere l'epitopo conformazionale G della gp51 ed il Mab F1 della nostra collezione, sono stati coniugati alla perossidasi utilizzando il Lightning-Link HRP conjugation kit (InnovaBioscience) originando i Mabs BLV2-CJ ed F1-CJ.

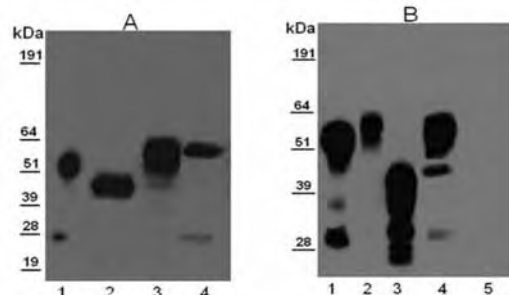
SDS-PAGE e Western blotting: Aliquote di terreno colturale sono stati processati in SDS-PAGE in Bis-Tris precast gel al 10% e successivamente trasferiti su membrana PVDF, come descritto nel manuale Invitrogen. L'evidenziazione delle proteine di interesse è stata effettuata in chemiluminescenza attraverso l'impiego di un Mab anti-gp51 (in grado di interagire con un epitopo lineare della gp51) e di un anti-mouse coniugato a perossidasi.

Prove ELISA competitive: i test sono stati effettuati impiegando il kit *homemade* con alcune modificazioni. Brevemente, le proteine sono state immobilizzate su piastra impiegando il Mab anti-gp51 come catcher. I sieri, positivo e negativo, sono stati aggiunti in diluizione da 1:10 sino a 1:1028 e dopo circa un'ora di incubazione e gli opportuni lavaggi, l'interazione antigenica anticorpo è stata rivelata impiegando i Mabs BLV2-CJ ed F1-CJ.

RISULTATI

L'espressione delle proteine ricombinanti gp51 e gp51_{C/A-179/182} è stata effettuata in condizioni denaturanti in Western blotting. I risultati ottenuti dimostrano che le proteine espresse in cellule BHK-21 e CHO-S presentano un peso molecolare (MW) superiore alla gp51 sintetizzata con le FLK (Figura 1A e B). In effetti è possibile osservare delle bande proteiche con un MW approssimativamente compreso tra i 60 ed i 62 kDa. Ciò significa che le proteine sintetizzate da queste due linee cellulari presentano uno stato di iperglicosilazione.

Fig. 1: A) Analisi in Western blotting della proteina gp51 espressa in cellule FLK (linea 1), Baculovirus (linea 2), cellule BHK-21 (linea 3) e cellule CHO-S (linea 4). B) Analisi della proteina gp51_{C/A-179/182} prodotta in cellule FLK (linea 1), cellule CHO-S (linea 2), Baculovirus (linea 3), cellule BHK-21 (linea 4), controllo negativo (linea 5).



Le proprietà antigeniche e la reattività verso gli anticorpi anti-BLV sono state saggiate con il test ELISA *homemade*. Quantitativamente le proteine sono sintetizzate ad un livello inferiore rispetto a quello osservato in baculovirus. Appare anche evidente che le BHK-21 sono più produttive delle CHO-S (Figura 2A e B).

Nella prospettiva del miglioramento dei tests diagnostici disponibili, l'antigene gp51_{C/A-179/182} prodotto in cellule CHO-S, è stato provato in un test ELISA di tipo competitivo. La sensibilità analitica del metodo è stata valutata saggiando in diluizioni scalari il siero positivo di riferimento E5 standardizzato dal Centro di Referenza Nazionale per lo studio dei Retrovirus dei Ruminanti. L'analisi sperimentale effettuata mediante l'impiego dei Mabs F1-CJ e BLV2-CJ, dimostra che la sensibilità analitica è significativamente superiore a quella dell'antigene ricombinante. Infatti il valore della DO_{450nm} comincia ad aumentare ad una diluizione del siero positivo compreso nel range 1:80-1:160 per l'antigene prodotto in baculovirus e tra 1:320-1:640 per la proteina prodotta in CHO-S (Figura 3).

Fig. 2: Test Elisa effettuato per la valutazione dell'espressione in cellule CHO-S, BHK-21 e cellule d'insetto per la proteina gp51_{C/A-179/182} (A) e gp51 (B).

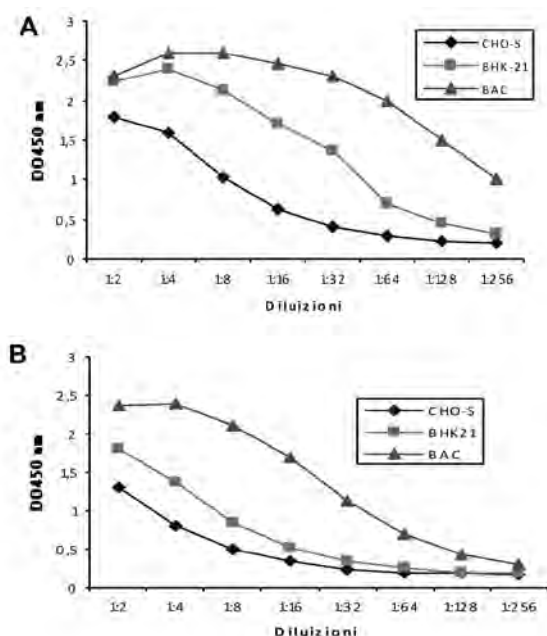
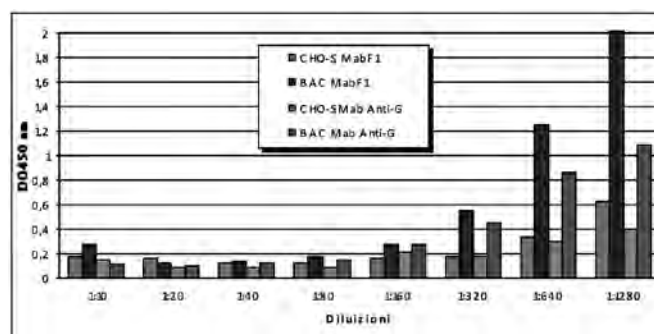


Fig. 3: Test Elisa competitivo eseguito mediante l'impiego dei Mabs F1-CJ e BLV2-CJ.



DISCUSSIONE

Precedenti studi hanno dimostrato che la gp51 e la sua forma deleta prodotte in sistema baculovirus (4,5) possono essere impiegate con ottimi risultati in test ELISA di tipo sandwich. L'impiego delle proteine ricombinanti in prove di tipo competitivo è stato limitato dall'instabilità della prima e dalla scarsa sensibilità analitica evidenziata dalla seconda. La sintesi della gp51_{C/A-179/182} ha fornito una molecola di stabilità analoga alla forma deleta e con la stessa bassa sensibilità.

Il sistema di espressione basato sull'impiego di cellule eucariotiche, rappresenta una valida alternativa, almeno su base teorica, per risolvere problema sopra esposto. Le proteine gp51 e gp51_{C/A-179/182} sono state espresse in cellule BHK-21 e in cellule CHO-S. L'analisi in Western blot ha evidenziato che questi antigeni presentano un grado di glicosilazione superiore a quella della gp51 *wild-type* e in accordo con quanto riportato in letteratura (6). I risultati ottenuti in ELISA, invece, dimostrano che queste proteine conservano la loro funzionalità a dispetto del loro elevato grado di glicosilazione. I valori delle DO_{450nm} mettono in evidenza che solo la proteina gp51_{C/A-179/182} viene espressa a buoni livelli in entrambe le linee cellulari. La maggiore sensibilità analitica dimostrata da questa proteina nel test competitivo la rende un'ottima candidata come antigene per un potenziale allestimento di un nuovo kit ELISA *homemade*.

Ovviamente ulteriori e più approfonditi studi dovranno essere effettuati per stabilire la funzionalità della gp51_{C/A-179/182} prodotta in BHK-21 oltre a valutare la possibilità di un'eventuale standardizzazione del metodo.

BIBLIOGRAFIA

1. Mahieux R, Gessain A: [New human retrovirus: HTLV-3 and HTLV-4]. *Med Trop (Mars)* 2005, 65:525-528.
2. Burny A, Cleuter Y, Kettmann R, Mammerickx M, Marbaix G, Portetelle D, Van den Broeke A, Willems L, and Thomas R. 1990. Facts and hypothesis derived from the study of an infectious cancer. In "Retrovirus Biology and Human Disease" (R. Gallo and F. Wong Staal, Eds.), pp. 9-25. Dekker, New York.
3. Sagata N., Yasunaga T., Tsuzuku-Kawamura J., Ohishi K., Ogawa Y., Ikawa Y. 1985. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukaemia virus: Its evolutionary relationship to other retroviruses, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 677-681.
4. De Giuseppe A., Feliziani F., Rutili D., De Mia G.M. 2004. Expression of bovine leucemia virus envelope glycoprotein (gp51) by recombinant baculovirus and its use in an ELISA test. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11 (1), 147-151.
5. De Giuseppe A., Forti K., Feliziani F., Severi G., Cagiola M. 2010. Purification by Strep-Tactin Affinity Chromatography of a Delete Envelope gp51 Protein of Bovine Leukaemia Virus Expressed in Sf21 Insect Cells. *Protein J* 29:153-160.
6. Altaner C., Merza M., Altanerova V. and B. Morein. Envelope glycoprotein gp51 of bovine leukemia virus is differently glycosylated in cells of various species and organ origin.

Veterinary Immunology and Immunopathology

RISULTATI PRELIMINARI DELLA RICERCA DI *LEISHMANIA* NELLE VOLPI IN PIEMONTE TRAMITE REAL TIME PCR, NEL CONTESTO DEL NUOVO PIANO REGIONALE SELVATICI.

Romano A.¹, Radaelli M. C.², Vitale N.², Chiavacci L.², Delvento P.², Maurella C.², Vitale F.³, Dondo A.⁴, Gorla M.¹

¹S.C. Biotecnologie, I.Z.S. del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta.

²S.C. Epidemiologia e Osservatorio Epidemiologico, I.Z.S. del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta.

³C.Re.Na.L.: Centro di Referenza Nazionale per le Leishmaniosi, I.Z.S. della Sicilia.

⁴S.C. Diagnostica Generale e coordinamento Sanità e Benessere Animale, I.Z.S. del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta.

Keywords: *Leishmania infantum*, RT PCR quantitativa, volpe.

SUMMARY

This study was carried out in Piedmont region and aimed to evaluate, within the Wildlife Regional Surveillance Program, the prevalence of *Leishmania infantum* infection in red foxes (*Vulpes vulpes*), by quantitative real time PCR. Reported data are referred to the first half-year 2011 to investigate a possible sylvatic cycle in a new endemic area.

INTRODUZIONE

La leishmaniosi viscerale canina (CanL), sostenuta da *Leishmania infantum*, è una zoonosi parassitaria endemica nel bacino Mediterraneo. I principali serbatoi sono i cani domestici, mentre il ruolo dei carnivori selvatici nell'epidemiologia della malattia rimane controverso [1].

Il Piemonte ha registrato focolai autoctoni di CanL a partire dal 1990, parallelamente a casi asintomatici di infezione umana [2]. La colonizzazione di zone considerate storicamente libere da parte di *Leishmania infantum*, potrebbe essere stata agevolata dalla diffusione di flebotomi competenti da aree endemiche, favorita dal surriscaldamento territoriale e concomitante ad un incremento delle movimentazioni di cani infetti.

Il Piano di Controllo Sanitario della Fauna Selvatica della Regione Piemonte, revisionato e operativo a partire dall'anno 2011, è stato predisposto sulla base delle recenti evidenze epidemiologiche nazionali e regionali di patologie infettive rilevanti ai fini della tutela sanitaria del patrimonio zootecnico e faunistico, con particolare attenzione anche alle patologie di carattere zoonosico. Per queste ragioni e sulla base delle osservazioni disponibili in bibliografia rispetto alla situazione nazionale [3], nel contesto del piano è stata inserita la ricerca sistematica di *Leishmania spp.* nelle volpi, in quanto non sono disponibili ad oggi dati sulla prevalenza di infestazione in Piemonte.

La metodica impiegata, armonizzata conformemente alle indicazioni del Centro di Referenza Nazionale per le Leishmaniosi (C.Re.Na.L.), prevede il rilevamento di DNA di *Leishmania spp.* con real time PCR di tipo quantitativo (qRT-PCR) ed è utilizzata anche per la diagnosi ed il monitoraggio dell'effetto della terapia nei cani domestici.

MATERIALI E METODI

Nel primo semestre 2011, come contemplato dal Piano Regionale di Controllo Sanitario della Fauna Selvatica, sono stati testati 67 linfonodi sottomandibolari provenienti da carcasse di volpi (*Vulpes vulpes*) rinvenute morte sul territorio o abbattute a scopo venatorio e inviate all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Torino.

I campioni di linfonodo sono stati analizzati tramite qRT-PCR (saggio TaqMan®), previa estrazione del DNA genomico con l'impiego del kit "illustra tissue & cells genomicPrep Mini Spin Kit" (GE Healthcare).

Ai fini dell'analisi quantitativa, in ogni amplificazione viene inclusa una curva di taratura, ottenuta amplificando diluizioni scalari in base 10, di una soluzione di DNA estratto da una coltura di

L. infantum del ceppo di riferimento MHOM/IT/80/IPT1. Il DNA di riferimento, quantificato e certificato, è stato fornito dal Centro di Referenza.

Le sequenze di primer (QLK2-UP e QLK2-DOWN) e sonda TaqMan® (Q-Leish Probe) utilizzati, unitamente all'allestimento della master mix, al profilo termico e ai cicli di amplificazione, sono stati precedentemente descritti da Vitale F. et al. (2004) [5].

RISULTATI E DISCUSSIONE

Dei 67 campioni sottoposti alla ricerca del DNA di *Leishmania spp.*, 6 sono risultati positivi (8,96%; IC95%: 3,36-18,48).

Le positività variano in un range da 2 leishmanie/ml a 10 leishmanie/ml.

Le prime positività sono state registrate a partire dal mese di marzo: due campioni sono stati riscontrati positivi a marzo, tre ad aprile e uno a maggio (la distribuzione dei prelievi è riportata nel grafico 1). I due campioni prelevati a marzo e quello di maggio, provengono da volpi abbattute nel territorio del medesimo comune, Melle, del Comprensorio Alpino "Valle Varaita" in provincia di Cuneo (CACN2), mentre gli altri tre campioni appartengono a volpi abbattute nel territorio del comune di Vercelli, nell'ambito territoriale di caccia "Pianura Vercellese Nord" (ATCVC1).

E' stata condotta un'analisi statistica per valutare l'eventuale associazione tra la positività per *Leishmania spp.* e territorialità (Comune, ASL, Provincia di provenienza delle volpi). Dal risultato riscontrato nel campione analizzato emerge che le volpi provenienti dal territorio del comune di Vercelli hanno una probabilità maggiore di essere positive rispetto al resto del Piemonte [test χ^2 di Mantel Hantzel: 7.4650 (OR: 9.2; IC 95%: 1,5-55,9)].

Sebbene i campioni analizzati fino ad ora siano esigui (la stagione venatoria è ancora nella pausa estiva), la distribuzione dei capi positivi (riportata nel grafico 1) potrebbe suggerire l'esistenza di aree circoscritte in cui si ha maggiore contatto tra ospite e vettori, la cui presenza stabile e cospicua di questi ultimi anni, è già stata ampiamente documentata in numerose aree del Piemonte [6], ancorché le volpi nell'età adulta siano frequentemente soggette a fenomeni di dispersione territoriale, con possibili spostamenti al di fuori delle aree di endemia.

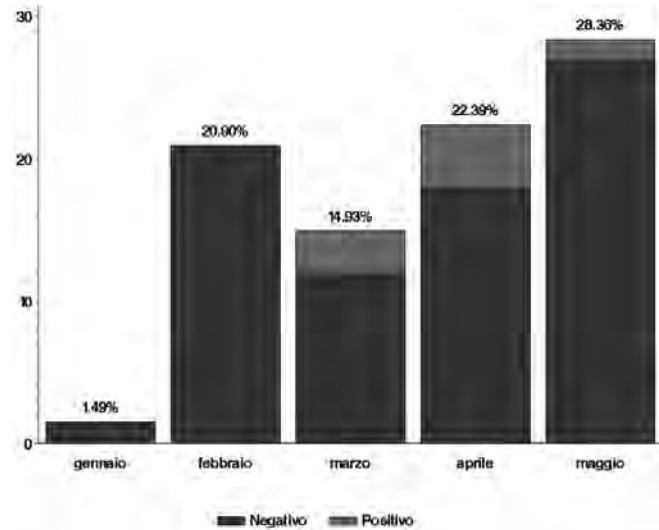
La bassa carica parassitaria riscontrata nei soggetti infestati, sembrerebbe comunque indicare l'esistenza di un ciclo silvestre in cui le volpi fungano da serbatoio asintomatico di riserva del parassita: nessuna delle volpi riscontrate positive alla qRT-PCR mostrava segni ascrivibili a leishmaniosi.

Data la difficoltà di reperire campioni di sangue relativamente alle specie selvatiche sensibili, l'impiego sistematico di questa metodica su tessuto linfonodale si dimostra una valida alternativa agli esami sierologici, per definire con maggior precisione il quadro epidemiologico territoriale e di popolazione della leishmaniosi.

L'eventuale estensione della metodica di indagine descritta nel presente lavoro ad altri canidi selvatici, potrebbe fornire ulteriori elementi utili a chiarire l'estensione di cluster di infezione nel territorio regionale, ai fini della predisposizione di

adeguate misure di protezione sia per i cani domestici sia per l'uomo, nell'ottica del potenziale zoonosico dell'infestazione da *Leishmania spp.*, nelle aree individuate a maggior rischio.

Grafico 1. Numero di volpi testate per *L. infantum* nel periodo gennaio-giugno 2011.



BIBLIOGRAFIA

1. Sobrino R, Ferroglio E, Oleaga A, Romano A, Millan J, Revilla M, Arnal MC, Trisciuglio A, Gortázar C. Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Vet Parasitol.* 2008 Aug 17; 155(3-4):198-203.
2. Biglino A, Bolla C, Concialdi E, Trisciuglio A., Romano A, Ferroglio E. Asymptomatic *Leishmania infantum* Infection in an Area of Northwestern Italy (Piedmont Region) Where Such Infections Are Traditionally Nonendemic. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 131-6.
3. Dipineto L, Manna L, Baiano A, Gala M, Fioretti A, Gravino AE, Menna LF. Presence of *Leishmania infantum* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in southern Italy. *J. Wildl. Dis.* 2007 Jul;43(3):518-20.
4. <http://www.izssicilia.it/index.php/it/crenal>
5. Vitale F, Reale S, Vitale M, Petrotta E, Torina A, Caracappa S. TaqMan-based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Oct;1026:139-43.
6. Ferroglio E, Romano A, Dettoni F, Trisciuglio A. Distribution of *Phlebotomus perniciosus* in North-Italy: A study on 18S rDNA of phlebotomine sand flies. *Vet. Parasitol.* 2010; 170: 127-130.

SVILUPPO DI UNA MULTIPLEX REAL TIME PCR PER LA IDENTIFICAZIONE E LA DIFFERENZIAZIONE DEL BVDV TIPO 1, 2 E 3.

Rossi E., Casciari C., Torresi C., Giammarioli M., De Mia G. M.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia.

Key words: BVDV, real-time PCR, diagnosi differenziale

SUMMARY

An atypical pestivirus belonging to the putative BVDV-3 species was recently isolated from clinically affected calves in Southern Italy. The detection of this novel virus might have implications on BVDV diagnosis as well as for prophylactic programs. To solve this problem, a single rapid step real-time multiplex PCR with an internal control was developed for simultaneous detection and differentiation of bovine diarrhoea virus type 1, 2 and 3 (BVDV-1/BVDV-2/BVDV-3). Partial 5'-NTR region was detected by TaqMan probes labelled with different fluorochromes. The sensitivity of the multiplex real-time PCR was higher compared to the end-point PCRs usually used for laboratory diagnosis. The assay allows rapid detection and differentiation of BVDVs and provides an efficient diagnostic tool.

INTRODUZIONE

Il virus della diarrea virale bovina (BVDV) appartiene alla famiglia *Flaviviridae*, genere *Pestivirus* (9). Oltre alle due specie BVDV-1 e BVDV-2 che risultano differenziabili su base genetica ed antigenica, recentemente altri pestivirus atipici sono stati identificati in lotti di siero fetale bovino in Brasile (D32/00_Hobi) (5), Svezia (SVA/cont-08) (2) e Italia (IZSPLV_To) (4), come pure in bovini infetti in Thailandia (Th/04_KhonKaen) (7, 8), in un bufalo in Brasile (Brz buf 9) (6) e in un allevamento con sindrome respiratoria in Italia (1). In base all'analisi di sequenza, questi pestivirus atipici formano un cluster geneticamente divergente da BVDV-1 e BVDV-2 che andrebbe a configurare una nuova specie denominata BVDV-3 (3). L'identificazione di nuovi pestivirus atipici in bovini naturalmente infetti, potrebbe avere importanti ripercussioni sia di ordine diagnostico che nei riguardi dei programmi di controllo della malattia. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di sviluppare una metodica multiplex real-time PCR in grado di identificare e differenziare il BVDV-1, il BVDV-2 e la nuova specie BVDV-3 che attualmente non viene identificata dalla maggior parte delle PCR convenzionali di più comune impiego nei laboratori diagnostici.

MATERIALI E METODI

Sono state testate diverse coppie di *primers* e *probes* (sonde *TaqMan*, *MGB*) prodotte con il software *Primers Express* (3.0) sulla base di sequenze *consenso* ottenute allineando isolati BVDV-1, BVDV-2 e BVDV-3 del nostro dataset di sequenze e ottenuti dalla GenBank. In base a prove preliminari, sono stati selezionati i *primers* e le *probes* riportati in tabella 1.

Tutti i *primers* e le *probes* esaminati amplificano un tratto della regione 5'-NTR del genoma virale.

Una mix contenente 50 ng di RNA in diluizioni logaritmiche dei virus di riferimento BVDV-1, BVDV-2 e BVDV-3 è stata utilizzata per valutare il limite di rilevabilità della prova. Per la validazione sono stati impiegati isolati BVDV-1 (*genotipi a, b, c, d, e, f, g e l*), BVDV-2 (*subgenotipo a*) e BVDV-3 della nostra banca virus. In aggiunta a ciò, sono stati analizzati una serie di campioni

clinici rappresentati da siero, sangue, organi, sieri fetali bovini. L'RNA virale è stato estratto con il kit QIAamp viral RNA Minikit (Qiagen) secondo le istruzioni indicate dalla ditta produttrice e stoccato a -80°C fino al momento dell'uso.

Tabella 1 - Sequenze nucleotidiche dei primers/probes

Nome	Sequenza
Pesti F	5'- CTAGCCATGCCCTTAGTAG -3'
Pesti R	5'- CGTCGAACCAAGTACGACT -3'
BVDV-3 F	5'- GGTTTCGACGCATCAAGGAAT -3'
BVDV-3 R	5'- GAGCCATATAATGACCCTCTTTCAC -3'
BVDV-1	5' FAM- TAGCAATGGTGAGTTCGTTGGATGGCT- TAMRA 3'
BVDV-2	5' VIC- TAGCGGTAGCAGTGA GTTCGTTGGATGGCCTAMRA 3'
BVDV-3	5' TET - CGTGCCACGGTGAATCTTAACCCA -TAMRA 3'

La multiplex real-time RT-PCR è stata messa a punto con il kit commerciale QuantiFast Pathogen RT-PCR + IC Kit (QIAGEN) e ottimizzata con differenti concentrazioni di *primers/probes*. Il saggio è stato condotto utilizzando un volume di reazione di 25ml, 20pmol/ml di ciascun primers, 10pmol/ml di ciascuna probe, 5ml della master mix QuantiFast Pathogen (5x), 0,25ml della RT master mix QuantiFast Pathogen RT-mix (100x), 2,5ml del 10x Internal Control Assay, 2,5ml del 10x Control RNA e infine 6ml della mix (BVDV-1, BVDV-2 e BVDV-3). Il profilo di reazione è stato il seguente: 20 min. a 50°C (RT), 5 min. a 95°C (inattivazione RT/attivazione *Taq* polimerasi), seguiti da 45 cicli di 15 sec. a 95°C (denaturazione) e 30 sec. a 58°C (appaiamento/elongazione) in un ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems).

I risultati della multiplex real time PCR sono stati valutati comparativamente con quelli ottenuti con la corrispondente single real-time PCR.

RISULTATI E DISCUSSIONE

La multiplex real-time RT-PCR è in grado di rilevare e identificare nello stesso tempo BVDV-1, BVDV-2 e BVDV-3. La sensibilità analitica della prova è stata determinata in 3 esperimenti indipendenti, utilizzando per ciascuno 3 repliche di ogni diluizione logaritmica dei virus di riferimento. L'analisi dei Ct in funzione della concentrazione virale ha mostrato un aumento lineare, pur con una diversa efficienza di amplificazione tra BVDV-1, BVDV-2 e BVDV-3 (Figura 1).

L'utilizzo del QuantiFast Pathogen RT-PCR + IC kit consente inoltre una corretta interpretazione dei risultati poiché l'impiego di un controllo interno di reazione nello stesso tubo, riduce sensibilmente l'evenienza di falsi negativi.

La sensibilità analitica e la riproducibilità *inter-assay* della prova sono riportate in tabella 2. Tutti gli isolati BVDV-1, BVDV-2 e BVDV-3 ottenuti da siero fetale bovino e dai campioni clinici, sono stati correttamente evidenziati.

Figura 1 - Limite di rilevabilità della multiplex real-time RT-PCR

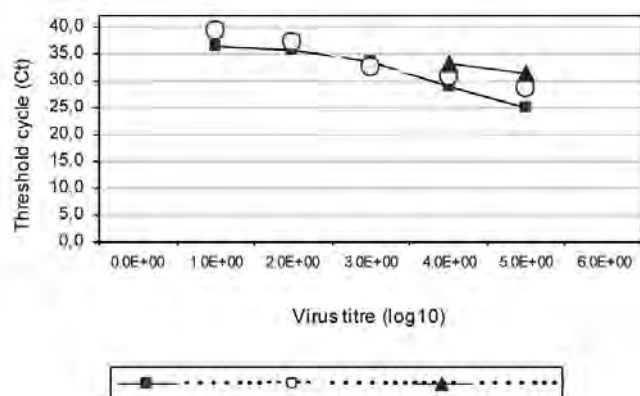


Tabella 2 – Sensibilità analitica e riproducibilità *inter-assay* della multiplex real-time RT-PCR

Threshold cycle (Ct ± SD)			
Virus (dil.)	BVDV-1	BVDV-2	BVDV-3
10 ⁻¹	24,93±0,62	28,62±0,97	31,50±1,02
10 ⁻²	28,96±0,33	30,72±0,64	33,06±1,25
10 ⁻³	33,36±0,78	32,42±0,81	no Ct
10 ⁻⁴	35,51±0,98	36,92±1,54	no Ct
10 ⁻⁵	36,14±1,51	39,22±0,98	no Ct
10 ⁻⁶	no Ct	no Ct	no Ct

In conclusione, la multiplex real-time PCR sviluppata nel presente studio è in grado di identificare e differenziare correttamente BVDV-1, BVDV-2 e BVDV-3. La continua segnalazione di lotti di siero fetale bovino contaminati con BVDV-3 e la ulteriore evidenza che tali pestivirus atipici possano rendersi responsabili di forme cliniche nel bovino, fanno sì che la circolazione di questa nuova specie virale costituisca una problematica emergente per i laboratori di diagnosi. La possibilità di introduzione accidentale di BVDV-3 nella popolazione bovina può avere ripercussioni estremamente negative sui programmi di controllo e di eradicazione nei confronti di questa malattia ed è per questo che una corretta diagnosi di laboratorio risulta essenziale.

BIBLIOGRAFIA

- Decaro Nicola, Maria Stella Lucente, Viviana Mari, Francesco Cirone, Paolo Cordioli, Michele Carmero, Rossana Scialetta, Michele Losurdo, Eleonora Lorusso, and Canio Buonavoglia. Atypical Pestivirus and Severe Respiratory Disease in Calves, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 17, n.8, (2011).
- Liu L., H. Xia, S. Belák and C. Baule, A TaqMan real-time RT-PCR assay for selective detection of recently described atypical bovine pestiviruses in clinical samples and biological products, *Journal of Virological Methods* **154** (2008), pp. 82–85.
- Liu L., J. Kampa, S. Belák and C. Baule, Virus recovery and full-length sequence analysis of atypical bovine pestivirus Th/04_KhonKaen, *Veterinary Microbiology* **138** (1–2) (2009), pp. 62–68.
- Peletto Simone, Fabio Zuccon, Monica Pitti, Elena Gobbi, Luisa De Marco, Maria Caramelli, Loretta Masoero, Pier Luigi Acutis. Detection and phylogenetic analysis of an atypical pestivirus, strain IZSPLV_To. *Research in Veterinary Science*, Epub ahead of print Nov. 18, 2010.
- Schirrmeier H., G. Strebelow, K. Depner, B. Hoffmann and M. Beer, Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolates, a putative member of a novel pestivirus species, *Journal of General Virology* **85** (2004), pp. 3647–3652.
- Stalder et al., 2005 H.P. Stalder, Ph. Meier, G. Pfaffen, C. Wageck-Canal, J. Rüfenacht, P. Schaller, C. Bachofen, S. Marti, H.R. Vogt and E. Peterhans, Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland, *Preventive Veterinary Medicine* **72** (2005), pp. 37–41.
- Ståhl K., J. Kampa, S. Alenius, A. Persson Wadman, C. Baule, S. Aiumlamai and S. Belák, Natural infection of cattle with an atypical 'HoBi'-like pestivirus-implications for BVD control and for the safety of biological products, *Veterinary Research* **38** (2007), pp. 517–523.
- Ståhl K., M. Beer, H. Schirrmeier, B. Hoffmann, S. Belák and S. Alenius, Atypical 'HoBi'-like pestiviruses—recent findings and implications thereof, *Veterinary Microbiology* **142** (1–2) (2010), pp. 90–93 (Review).
- Thiel, H.J., Collett, M.S., Gould, E.A., Heinz, F.X., Houghton, M., Meyers, G., Purcell, R.H., Rice, C.M., 2005. *Genus Pestivirus*. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.), *Virus Taxonomy-Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, pp. 988–998.

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute, RC004/2010 IZSUM, (DL 502/92, art. 12)

***Mycobacterium avium* subsp. *avium* IN UN ALLEVAMENTO SUINO: DIAGNOSI E CONSIDERAZIONI PRELIMINARI SU POSSIBILI FONTI DI INFEZIONE**

Rossi F., Zoppi S., Garrone A., Gorla M., Varello K., Dondo A.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta

Keywords: *Mycobacterium avium* – swine – condemned carcasses

SUMMARY

Mycobacterium avium outbreaks can lead to severe economic losses due to the condemnation of swine carcasses. This report describes the application of diagnostic techniques on tissues in four affected pigs from the same farm in order to identify and characterize the aetiological agent.

Bacteriological examinations, histopathological and molecular techniques lead to detect the presence of *M. avium* subsp. *avium* (MAA) in all submitted samples, revealing a severe form of contamination in the breeding herd.

INTRODUZIONE

Il cluster tassonomico *Mycobacterium avium* complex (MAC) comprende specie e sottospecie batteriche con differenti gradi di patogenicità, spettro d'ospite e diffusione ambientale. Si tratta spesso di germi ubiquitari, rilevabili in riserve idriche naturali e artificiali, terreno, compost, prodotti alimentari. I principali reservoir sono i volatili selvatici e domestici ma si segnalano infezioni anche in altre specie animali, uomo compreso (1,2).

Grazie all'ausilio della biologia molecolare, nell'ambito dei MAC, è stato possibile differenziare sottospecie a se stanti prima considerate sierotipi di *M. avium*, quali *M. avium* subsp. *avium* (MAA) e *M. avium* subsp. *hominissuis* (MAH).

M. avium subsp. *avium*, agente causale riconosciuto della tubercolosi aviaria, è un patogeno stretto, di difficile riscontro al di fuori dell'organismo ospitante ma, pur trovando nei volatili gli ospiti di elezione, può infettare altre specie, tra cui suino e uomo. Solitamente l'infezione in specie diverse dai volatili si manifesta con lesioni a carico di singoli distretti linfonodali principalmente afferenti al tratto digerente ed è solitamente a carattere autolimitante (4).

M. avium subsp. *hominissuis*, ha un ampio spettro d'ospite, ed è un patogeno opportunista largamente diffuso nell'ambiente. Gli stipti appartenenti a questa sottospecie denotano una notevole variabilità, come rivelano le tecniche di caratterizzazione molecolare applicate sugli isolati, e sono di più frequente riscontro nelle patologie dell'uomo e del suino rispetto a *M. avium* subsp. *avium*.

Nei suini colpiti, raramente si palesa una sintomatologia clinica, ma è possibile il riscontro, in sede di macellazione, di lesioni anatomo-patologiche (6), fonte di perdite economiche connesse al deprezzamento o alla distruzione delle carcasse colpite (3,5). Si segnalano inoltre casi di aborto e trasmissione congenita.

Scopo del lavoro è indagare un focolaio riconducibile a MAC in un allevamento suino e la possibile fonte di infezione servendosi di valutazioni anamnestiche e tecniche di laboratorio che comprendono analisi microbiologiche, istopatologiche e biomolecolari.

MATERIALI E METODI

In sede ispettiva, sono state destinate alla distruzione le carcasse di quattro suini provenienti da due partite di 135

soggetti ciascuna e la cui origine era riconducibile a differenti centri di ingrasso ma efferenti dalla medesima scrofaia.

Indagine anamnestica: L'azienda di provenienza è caratterizzata da una struttura a ciclo chiuso e da un'organizzazione multisito: i suinetti, nati da un'unica scrofaia (sito1), raggiunto il peso di 7 Kg, vengono inviati a siti "2" (A e B) e successivamente ridistribuiti, al peso di 50 Kg, a 8 differenti centri di ingrasso o mantenuti in loco fino al raggiungimento dei 160 Kg (età di circa 9/10 mesi). La fase di magronaggio delle due partite in esame, in particolare, è avvenuta in un caso nel sito 2 A e nell'altro nel sito 2 B.

Campionamenti: Alla macellazione da ognuno degli animali con lesioni sono stati prelevati ed inviati refrigerati per accertamenti diagnostici i linfonodi sottomandibolari e meseraici e porzioni di fegato con lesioni.

Esame anatomo-patologico: I campioni prelevati sono stati esaminati per la presenza di lesioni tubercolari ed appurarne tipologia, numero e dimensioni.

Isolamento batteriologico: Porzioni degli organi, previa eliminazione di tessuto adiposo e connettivale, sono state sminuzzate e omogeneizzate in stomacher; l'omogenato è stato quindi suddiviso in aliquote sottoposte a due differenti metodi di decontaminazione con NaOH 2% e HPC 1.5% rispettivamente. Le aliquote decontaminate sono infine state seminate su una batteria di terreni selettivi composta da Stonebrink, Lowenstein Jensen Medium, Lowenstein Jensen w/o glicerina ed incubate in termostato per un periodo di 60 giorni.

Esame istopatologico: Ogni campione è stato fissato in formalina al 10% e sottoposto alle procedure standard di inclusione in paraffina. Si è poi proceduto al taglio su piani differenti di sezioni di 4±2µ di spessore. Parte di queste sono state destinate alla colorazione con Ematossilina-Eosina (EE) e parte alla colorazione Ziehl-Neelsen (ZN) per l'evidenziazione di batteri alcool-acido resistenti.

I preparati istologici sono stati esaminati al microscopio ottico ad ingrandimenti crescenti (10x, 20x, 40x e 100x).

In particolare per la colorazione ZN, per valutare l'idoneità della colorazione è stato utilizzato un controllo positivo di linfonodo bovino confermato positivo per *M. bovis* all'esame culturale. I preparati sono stati esaminati attentamente nell'intera sezione ad ingrandimento 100x, e valutati come positivi in base alla presenza di uno o più micobatteri.

Identificazione molecolare dei ceppi isolati: Le colonie isolate mediante crescita su terreni selettivi sono state sottoposte a estrazione del DNA tramite bollitura; l'identificazione e la tipizzazione molecolare delle diverse specie di micobatteri (*Mycobacterium* spp, *M. tb* complex, *M. avium* e *M. tuberculosis*) è stata eseguita con Multiplex PCR, variazione "in house" dei metodi descritti da J.K. Kulski *et al.* (9) e da K. Sinclair *et al.* (10).

Le colonie classificate come *M. avium* sono state successivamente sottoposte ad analisi per la presenza della regione IS901 e della regione IS1245 al fine della

differenziazione di sottospecie *M. avium* subsp. *avium* e *M. avium* subsp. *hominissuis*. Sono state così allestite due simplex PCR mediate rispettivamente dai primers IS901-se (5'-GTGATCAAGCACCTTCGGAA-3') e IS901-pe (5'-GCTGCGAGTAGCTTGATGAG-3') secondo quanto descritto da Slana I. *et al.* (7), e dai primers IS1245-P1 (5'-GCCGCCGAAACGATCTAC-3') e IS1245-P2 (5'-AGGTGCCGTCGAGGAAGAC-3') secondo quanto descritto da Guerrero C. *et al.* (8).

I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel di Agarosio (2%).

RISULTATI

Il quadro anatomo-patologico era sovrapponibile in tutti e quattro i soggetti esaminati. I linfonodi della testa e i meseraici presentavano iperplasia diffusa ed aree necrotico-calcifiche a livello centrale; il parenchima epatico era diffusamente infiltrato da formazioni rotondeggianti di consistenza lardacea. All'esame istopatologico il quadro microscopico evidenziato corrispondeva a lesioni multiple granulomatose caratterizzate da massiva reazione linfoistiocitaria ed epitelioidi con presenza di numerose cellule giganti multinucleate.

Uno solo dei campioni analizzati, rappresentato da tessuto epatico, è risultato positivo alla colorazione di ZN con presenza di bastoncini alcool acido resistenti, di circa 4 µm, evidenziati a livello delle cellule giganti multinucleate.

La semina su terreni di coltura ha portato in tutti i casi alla crescita di colonie batteriche che mediante caratterizzazione molecolare sono state identificate prima come *M. avium* e successivamente tipizzate come *M. avium* subsp. *avium*, per la presenza di entrambi gli elementi di inserzione IS901 e IS1245 (*M. avium* subsp. *hominissuis* si distingue per l'assenza della sequenza IS901) (8).

DISCUSSIONE

La grande diffusione ambientale dei batteri appartenenti al MAC è talvolta un ostacolo all'agevole individuazione della fonte di infezione di un focolaio. La raccolta dei dati anamnestici ed uno studio epidemiologico per l'individuazione dei potenziali fattori di rischio presenti in azienda sono spesso l'unica via per risalire all'origine dell'evento morboso.

L'isolamento colturale dell'agente eziologico e la successiva caratterizzazione molecolare degli isolati clinici possono agevolare questo iter diagnostico integrato.

Come già descritto in letteratura, la frequente localizzazione a livello dei linfonodi meseraici e cervicali suggerisce come via di introduzione preferenziale quella alimentare (1, 4); anche nel caso da noi descritto, la localizzazione delle lesioni a carico di tali distretti suggerirebbe un'introduzione dell'infezione in azienda per via alimentare, con conseguente penetrazione attraverso la mucosa gastrointestinale e transito attraverso il sistema linfatico e portale. Congiuntamente, è tuttavia da notare che l'infezione per via alimentare è solitamente connessa ad una bassa carica infettante (per effetto "diluizione" nell'alimento), e ad una conseguente ridotta morbilità. Nello studio da noi condotto, invece, la percentuale di soggetti colpiti da forma generalizzata e provenienti dal medesimo centro di riproduzione (anche considerando quelli recentemente riscontrati e non ancora conteggiati perché con accertamenti diagnostici in corso) è superiore alle attese. Tale dato deporrebbe a favore di un episodio ben più grave rispetto ad una comune contaminazione per via alimentare del settore ingrasso, perché suggerirebbe anche una trasmissione congenita o perinatale a livello della

scrofaia d'origine. A supportare l'ipotesi vi è anche il riscontro, in tutti i soggetti esaminati, di lesioni generalizzate a carico dell'apparato gastroenterico e respiratorio.

Un ulteriore punto di discussione è rappresentato dall'identificazione di MAA, invece del più frequente MAH; questo aspetto rende ancora più interessante il riscontro, infatti in bibliografia si segnala la possibilità di infezione congenita da MAH, mentre le modalità di trasmissione di MAA non sono ancora del tutto definite.

L'assenza di sintomatologia clinica ha finora consentito rilievi solo in sede di macellazione dei soggetti all'ingrasso, ma la portata del problema pare essere maggiore visti anche i nuovi e recenti reperti, tuttora in corso d'analisi, che hanno interessato altri centri d'ingrasso collegati alla medesima scrofaia.

Tra i possibili interventi da attuarsi in sede di allevamento, c'è l'intenzione di condurre un'indagine sierologica sulle scrofe ed esami microbiologici e molecolari sugli stessi animali e su campioni ambientali così da individuare o la fonte d'infezione e/o eventuali riproduttori infetti ed eliminatori al fine di contenere la diffusione dell'infezione e di limitare le perdite economiche in sede di macellazione.

BIBLIOGRAFIA

- Wellenberg G. J., de Haas P.E.W., van Ingen J., et al (2010) Multiple strains of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* infections associated with aborted fetuses and vswasting in pigs. *Veterinary record*, 167: 451- 454.
- Johansen T. B. (2010) Biofilm formation by *Mycobacterium avium* isolates originating from humans, swine and birds. *BMC Microbiol* 9:159. 2009
- Matlova I., et al., (2005) distribution of *Mycobacterium avium* complex isolates in tissue samples of pigs fed peat naturally contaminated with mycobacteria as a supplement. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 1261-1268.
- Hibiya K., Kasumi Y., Sugawara I., et al., (2008) Histopathological classification of systemic *Mycobacterium avium* complex infections in slaughtered domestic pigs. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases (CIMI)*, 31: 347 – 366.
- Alvarez J., Castellanos E., Romero B., et al. (2011) Epidemiological investigation of a *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* outbreak in swine. *Epidemiol. Infect.*, 139: 143-148
- Thorel M.F., Huchzermeyer H.F., Michel A.L.(2001). *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* infection in mammals. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 20 (1):204-218
- Slana I, Kaevska M, Kralik P, Horvathova A, Pavlik I (2010): Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *M. a. hominissuis* in artificially infected pigs studied by culture and IS901 and IS1245 quantitative real time PCR. *Veterinari Microbiology* 144, 437–448.
- C Guerrero, C Bernasconi, D Burki, T Bodmer, and A Telenti, 1995. A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. *J Clin Microbiol.* 1995 February; 33(2): 304–307.
- Kulski J.K. et al., 1995. Use of a Multiplex PCR to detect and identify *M. avium* and *M. intracellulare* in blood culture fluid of AIDS patients. *J. Clin. Microbiol.* 33(8) : 668-674.
- Sinclair K. et al.1995 - A Multiplex PCR for distinguishing *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Mol. Cell. Probes* 9: 291-295

CONTROLLI SECONDO IL REG. CE 2073/05 E SS.MM.II. SU MOLLUSCHI BIVALVI VIVI, ECHINODERMI, TUNICATI E GASTEROPODI VIVI IN REGIONE PIEMONTE (2009-2010)

Rubinetti F.¹, Decastelli L.², Galleggiante Crisafulli A.¹, Gallina S.², Bianchi D. M.², Chiavacci L.¹, Barbaro A.¹

¹S.S. Osservatorio Epidemiologico, Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino;

²S.C. Controllo Alimenti e Igiene delle Produzioni, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

Parole chiave: molluschi bivalvi vivi, *E. coli* MPN, *Salmonella*

Key words: live bivalve molluscs, *E. coli* MPN, *Salmonella*

SUMMARY

Live bivalve molluscs are vehicle of many pathogens. According to Regulation (EC) N° 2073/05, food safety criteria for shellfish placed in the market are represented by *E. coli* and *Salmonella* spp. Both of them are correlated to a fecal contamination and can be used as hygiene indicator of sea water where molluscs are cultured and depurated.

This paper presents data obtained by Official Control in Piedmont from 2009 to 2010 a total of 44 samples are analyzed. The results of bacterial parameters showed 6/38 samples (15,8%) not compliant for *E. coli* and the absence of *Salmonella* spp.

INTRODUZIONE

Il ruolo dei molluschi bivalvi nella trasmissione di alcune patologie all'uomo è noto ormai da tempo. I molluschi bivalvi sono organismi filtratori che possono concentrare al loro interno batteri, virus e contaminanti chimici eventualmente presenti nell'ambiente marino. Per questa loro caratteristica, sono dei perfetti bioindicatori di qualità dell'acqua, ma sono anche responsabili di diverse malattie gastroenteriche (3,4).

I molluschi hanno sempre costituito un problema per la salute umana: secondo i dati pubblicati nell'ultimo report dell'EFSA "Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks, nel 2009 sono state riscontrate non conformità per *Salmonella* spp nel 3,4% dei campioni di molluschi bivalvi.

Salmonella risulta uno degli agenti maggiormente coinvolti in casi epidemici (35,4%); in particolare l'1,4% dei casi è stato associato al consumo di prodotti della pesca, mentre l'1% al consumo di crostacei, molluschi bivalvi e prodotti derivati (1).

A livello nazionale, i dati riportati nel rapporto annuale "Vigilanza e controllo degli alimenti e delle bevande in Italia" pubblicato dal Ministero della Salute nel 2009, mettono in evidenza che il 3,7% di non conformità analitiche è stato rilevato su campioni di pesci, crostacei e molluschi. Tra le contaminazioni microbiologiche è emerso che la più frequente è quella legata alla presenza di *E. coli* in pesci, crostacei e molluschi (2).

La raccolta e la commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi sono subordinate alla conformità dei parametri igienico-sanitari individuati dai Regolamenti CE 852/04, 853/04, 854/04 e 2073/05 (*Salmonella* ed *E. coli*).

Il presente lavoro riporta i risultati dei controlli ufficiali effettuati nel biennio 2009-2010 su campioni prelevati in commercio, secondo quanto previsto dai criteri di sicurezza indicati nel Reg. CE 2073/05 e ss.mm.ii.

MATERIALI E METODI

I prelievi sono stati eseguiti secondo quanto previsto dal Regolamento CE 2073/05 e ss.mm.ii. prevedendo 5 u.c. per la ricerca di *Salmonella* e 1 u.c. (costituita da almeno 10

animali) per la ricerca di *E. coli*. Nel periodo 2009-2010 sono stati analizzati 44 campioni di molluschi bivalvi vivi, posti in commercializzazione; nello specifico 10 vongole, 31 mitili e 3 ostriche

I campioni sono stati esaminati presso i Laboratori Controllo Alimenti dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (IZSPLV).

per il conteggio di *E. coli* nei molluschi bivalvi vivi i laboratori applicano il protocollo della norma internazionale ISO/TS 16649-3 attraverso la numerazione con la tecnica del Most Probable Number. La metodica prevede una prima fase di preparazione del campione mediante pulizia, apertura dei molluschi, raccolta e l'omogeneizzazione del corpo e liquido intervalvare sino ad ottenere, con un minimo di 10 individui, una quantità compresa tra 50 e 100 g complessivi; una seconda fase prevede l'arricchimento selettivo ed infine l'interpretazione ed espressione dei risultati: per risalire al numero più probabile (MPN) per 100 g di campione.

Per l'isolamento di *Salmonella* spp, il protocollo applicato dall'IZSPLV fa riferimento alla norma internazionale ISO 6579. Secondo tale metodica, dal campione si prelevano 25 gr e mediante successivi passaggi di prearricchimento, arricchimento selettivo e semina su terreni agarizzati selettivi è possibile isolare, qualora presenti, colonie sospette. Tali colonie sono quindi sottoposte a identificazione biochimica e ad eventuale sierotipizzazione secondo lo schema di Kauffman – White.

RISULTATI

Poiché sui campioni il Regolamento CE 2073/05 e ss.mm.ii. prevede la ricerca di entrambi i parametri (*E. coli* e *Salmonella*) abbiamo calcolato un indicatore di efficienza di campionamento, ovvero numero di campioni in cui sono stati richiesti ed effettuati entrambi i parametri previsti dal regolamento. Sono risultati appropriati 37 campioni su 44 (84%); in 1 campione è stato richiesto ed effettuato solo *E. coli*; in 6 campioni solo *Salmonella*.

I risultati delle analisi relative alla numerazione di *E. coli* con metodo MPN hanno messo in evidenza 6 campioni non conformi su 38 analizzati (15,8%); le analisi per *Salmonella* spp. sono risultate tutte conformi (tabella 1).

Tabella 1: N° campioni analizzati per criterio

Criterio	N° campioni	N. campioni non conformi	% campioni non conformi
<i>E. coli</i>	38	6	15,8
<i>Salmonella</i>	43	0	0,0

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti mostrano l'assenza di *Salmonella* spp nei molluschi bivalvi che sono potenzialmente i prodotti della pesca più a rischio; il riscontro di positività per *E. coli*, seppur a livelli non elevati, è un dato da tenere in considerazione nell'ambito della Salute Pubblica; infatti, *E. coli* sebbene provochi sintomi gastrointestinali di lieve entità che non determinano il ricorso al sistema sanitario risulta un indicatore della presenza di altri patogeni rilevanti per la Salute Pubblica.

L'indicatore di efficienza che abbiamo individuato mette in evidenza la necessità di prestare maggior attenzione alla relazione individuata dal regolamento tra matrice e criterio al fine di evitare che in futuro i criteri previsti su tali matrici sfuggano ai controlli ufficiali.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009, EFSA (2011).
- 2) Vigilanza e controllo degli alimenti e delle bevande in Italia anno 2009 <http://www.salute.gov.it>
- 3) Incidence and role of Salmonella in Seafood safety, G. Amagliani, G. Brandi, G.F. Schiavano Food Research International ARTICLE IN PRESS
- 4) Molluschi bivalvi vivi ed echinodermi, tunicati e gasteropodi marini vivi. Food in, Numero 1, 2010

DIAGNOSI DI MASTITE BOVINA MEDIANTE TERRENO CROMOGENO

Sagrafoli D., Giacinti G., Tammaro A., Pietrini P., Patriarca D., Zucchitta P., Bovi E., Rosa G., Amatiste S.

Key words: chromogenic medium , udder milk, pathogen mastitis

SUMMARY

Aim of this study was tested milk udder samples by using chromogenic medium. 223 udder milk samples collected from dairy cattle in different farms in the province of Rome, were analyzed for the detection of pathogen mastitis. Samples were plated on 5% sheep blood agar, Edward's Medium Modified and on CHROMagar Mastitis GN, CHROMagar Mastitis GP. In this study 123 strains of 150 were correctly identified by chromogenic medium, and some strains were not detected.

INTRODUZIONE

La mastite rappresenta a tutt'oggi, una delle principali patologie dell'allevamento della vacca da latte e costituisce la principale causa di eliminazione degli animali con ingenti perdite economiche e peggioramento delle caratteristiche quali-quantitative del latte (6, 10).

Le forme di mastite sub-clinica sono le più diffuse negli allevamenti, e non causando macroscopiche alterazione del latte e della mammella, risulta difficoltoso da parte dell'allevatore individuarle tempestivamente con la probabile evoluzione in forme cliniche. I soggetti con mastite sub-clinica, costituendo un reservoir di microrganismi, possono diffondere l'infezione nell'allevamento.

Numerosi sono i microrganismi che causano mastite, anche se poco più di 10 sono le specie batteriche responsabili di oltre il 95% delle infezioni intramammarie (7, 2, 4). *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* sono i principali responsabili di mastite contagiosa con una elevata prevalenza negli allevamenti bovini da latte (3). Le infezioni da contagiosi evolvono generalmente in forma sub-clinica, talvolta in forma clinica, con la tendenza alla cronicizzazione (4) e sono in grado di diffondere rapidamente tra le bovine in lattazione.

Tra i germi di tipo ambientale *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, enterococchi e coliformi sono quelli più frequentemente isolati (3). Legati a condizioni ambientali di scarsa igiene, causano prevalentemente forme di mastite clinica soprattutto nella prima fase di lattazione; alcuni ceppi mostrano resistenze multiple a quelle molecole antibiotiche di cui si è fatto largo uso (3,1).

Risulta fondamentale per la profilassi della mastite, oltre a determinate strategie gestionali, l'individuazione degli animali con patologie mammarie attraverso sistemi diagnostici rapidi. Sono state sviluppate diverse metodologie, soprattutto di tipo biomolecolare (9,5), per la identificazione rapida dei microrganismi mastidogeni, tuttavia questi metodi non consentono sempre di valutarne la suscettibilità antimicrobica (9) e richiedono un'alta specializzazione del laboratorio in termini di personale e attrezzature.

Obiettivo di questo lavoro è stato di confrontare l'impiego di terreni cromogeni per la ricerca di microrganismi mastidogeni rispetto al metodo microbiologico in uso nel laboratorio.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati 223 campioni di latte di capezzolo bovino per la ricerca di agenti mastidogeni, provenienti da diverse aziende della provincia di Roma.

I campioni sono stati seminati in ragione di 10 µl di latte con ansa monouso sterile su Agar Sangue e Edward's Medium

Modified secondo la procedura in uso nel laboratorio e sui terreni cromogeni CHROMagar Mastitis. Il CHROMagar Mastitis GN per l'isolamento differenziale dei batteri Gram negativi: *Proteus mirabilis*, *Klebsiella*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*; il CHROMagar Mastitis GP per l'isolamento differenziale di *S. agalactiae*, *S. aureus* e *S. uberis*. Le piastre sono state incubate a 37°C in aerobiosi per 24-48 ore e osservate quotidianamente.

Secondo quanto descritto dalla casa produttrice, sul terreno CHROMagar Mastitis GP le colonie riferibili a *S. aureus* appaiono malva con alone malva, a *S. agalactiae* blu-verde e a *S. uberis* blu metallico.

Sul terreno CHROMagar Mastitis GN le colonie di *E. coli* appaiono rosse, quelle di *Klebsiella* spp blu metallico, di *Proteus mirabilis* marrone, mentre la *Candida albicans* cresce con colonie bianco opaco. Tutte le colonie sospette sviluppate sui terreni classici sui cromogeni utilizzati sono state isolate e sottoposte a test fenotipici e biochimici (gallerie Api bioMérieux®) (11).

RISULTATI

Dei 223 campioni esaminati, 72 (32,7%) sono risultati negativi con entrambe le metodiche utilizzate. Complessivamente i campioni risultati positivi all'esame microbiologico sono stati 150 (67,3%) con il metodo in uso del laboratorio. Di questi campioni, il CHROMagar GP/GN ne ha rilevati 131 (59,2%) positivi, mentre in 10 non è stata evidenziata crescita batterica. Da 9 campioni si è avuto sviluppo di colonie non descritte dalle schede d'uso del terreno CHROMagar GP/GN.

In nessun campione è stata osservata la co-presenza di più specie batteriche con entrambi i metodi.

Tabella 1: microrganismi Gram positivi (numero e percentuale) isolati da campioni di latte bovino con la procedura NMC e CHROMagar GP

Specie batterica	NMC N°microrg.	CHROMagar GP N°microrg.
<i>S.aureus</i>	47 (45,6%)	47 (52,8%)
<i>S.agalactiae</i>	19 (18,4%)	19 (21,3%)
<i>S.uberis</i>	16 (15,5%)	23 (25,9%)
<i>E.faecalis</i>	4 (3,9%)	*
<i>E.faecium</i>	2 (1,9%)	*
<i>E.durans</i>	1 (0,9%)	*
<i>S.dysgalactiae</i>	7 (6,8)	**
<i>S.canis</i>	3 (2,9%)	***
<i>Arc. pyogenes</i>	2 (1,9%)	***
<i>Coryneb. bovis</i>	2 (1,9%)	***
Totale	103	89

*: colonie blu metallico riferibili a *S.uberis*;

**: specie batterica cresciuta ma non descritta

***: specie batterica non cresciuta

Dei 150 isolati, secondo la nostra procedura, 103 appartenevano ai Gram positivi (Tabella 1), e 47 ai Gram negativi (Tabella 2).

Sul CHROMagar GP lo sviluppo di colonie caratteristiche è stato evidenziato in 89 (86,4%) campioni. Non è stata osservata crescita batterica in 7 (6,8%) campioni, mentre in altri 7 (6,8%) è stato riscontrato lo sviluppo di colonie non descritte.

Degli 89 isolati cresciuti come tipici sul CHROMagar GP, 82 (79,6%) sono stati correttamente confermati, mentre 7 (7,9%) ceppi riferibili a *S.uberis*, sono stati identificati come *E. faecalis* (n=4), *E. faecium* (n=2), *E. durans* (n=1) con i test di conferma. Sul CHROMagar GP non è stata osservata la crescita di *S. canis* (n=3), *A. pyogenes* (n=2), *C. bovis* (n=2), mentre colonie di colore verde chiaro, non descritte dalla scheda d'uso del terreno, sono state identificate come *S. dysgalactiae* (n=7).

Sul terreno CHROMagar GN (tabella 2), colonie caratteristiche sono state rilevate in 42 (89,4%) campioni, in 2 (4,2%) non è stata evidenziata crescita batterica mentre in 3 (6,3%) è stata osservata una crescita non caratteristica.

Dei 42 ceppi batterici cresciuti con colonie caratteristiche, 41 (97,6%) sono stati correttamente confermati con i test fenotipici e biochimici, mentre un isolato (2,4%) riferibile a *Klebsiella* spp secondo le indicazioni del terreno, è stato identificato come *E. cloacae*. Inoltre *P. multocida* (n=2) è stata inibita, e *S. marcescens* (n=3) ha dato luogo a colonie di colore viola, non descritte dalla scheda d'uso.

Tabella 2: microrganismi Gram negativi (numero e percentuale) isolati da campioni di latte bovino con la procedura NMC e CHROMagar GN

Isolato batterico	NMC	CHROMagar GN
Proteus mirabilis	5 (10,6%)	5 (11,9%)
<i>Klebsiella</i> spp	2 (4,2%)	3 (7,1%)
<i>E. coli</i>	34 (72,3%)	34 (80,9%)
<i>Ente. cloacae</i>	1 (2,1%)	*
<i>S. marcescens</i>	3 (6,4%)	**
<i>Past. multocida</i>	2 (4,2%)	***
Candida spp	0	0
Totale	47	42

*: colonie blu metallico riferibili a *Klebsiella*;

** : specie batterica cresciuta ma non descritta

***: specie batterica non cresciuta

DISCUSSIONE

Complessivamente i due terreni cromogeni utilizzati hanno correttamente identificato 123 isolati su 150. Il CHROMagar GP ha rilevato la presenza di *S.aureus* e *S.agalactiae* nel 100% dei casi; il CHROMagar GN ha rilevato la presenza di *E.coli* e *P. mirabilis* nel 100% dei casi.

Su entrambi i terreni cromogeni, diverse specie batteriche

non sono cresciute, mentre altri microrganismi hanno mostrato colonie con caratteristiche non descritte dalla ditta produttrice. Le specie batteriche non sviluppate e quelle non descritte hanno rappresentato il 13,6% (14/103) tra gli isolati Gram positivi e il 10,6% (5/47) tra i Gram negativi.

Occorre sottolineare che in una prima fase di utilizzo del terreno CHROMagar l'individuazione del colore delle colonie sospette può risultare critica, considerata la diversa interpretazione degli operatori. Si ritiene che nei laboratori non specializzati nella diagnostica delle mastiti questi terreni potrebbero facilitare l'individuazione dei principali microrganismi causa di mastite.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia la ditta International P.B.I. per aver gentilmente fornito il terreno CHROMagar mastitis.

BIBLIOGRAFIA

- 1-Amatiste S., Giacinti G., Tammara A., Sagrafoli D., Rosa G., Franco A., Rosati R. 2011. Antimicrobial susceptibility of streptococcus spp isolated from bovine mastitis in Lazio Region. XVIII Lancefield International Symposium.
- 2-Bradley AJ., Leach KA., Breen JE., Green LE., and Green MJ. 2007. Survey on the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. Vet. Rec. 160:253-258.
- 3-Giacinti G., Amatiste S., Tammara A., Franco A., Di Matteo P., Cordaro J. Sorbara L., Rosati R. 2008. Sensibilità antimicrobica in vitro di batteri isolati da campioni di latte di capezzolo bovino. 6 Congresso Nazionale del Mastitis Council.
- 4-Koivola M., Mantysaari EA., Pitkala A., and Pyorala S. 2007. Distribution of bacteria and seasonal and regional effects in a new database for mastitis pathogens in Finland. Acta Agric. Scand. 96. 89-96
- 5-Koskiken MT., Holopainen J., Pyorala S., Bredbacka P., Pitkala A., Solverod L., Piccinini R., Kelton D., Lehmusto H., Niskala S., Salmikivi L. 2009. Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. J. Dairy Sci. 92: 952
- 6-Huijps K., JGM Lam T., Hogeveen H., 2008. Costs of mastitis: facts and perception. Journal of Dairy Research. 75. 113-120.
- 7-Makovec J., Ruegg P.L., 2003. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. J.Dairy Sci. 86:3466-3472
- 8- Radaelli G.,1966. Aspetti clinici ed anatomo-istopatologici delle mastitis croniche da Str. Agalactiae e da *Staph. aureus*. Arch. Vet. It. 17: 201-235
- 9-Riffon R., Sayasith K., Khalil H., Dubreuil P., Drolet M., Lagacé J. 2001. Development of a Rapid and Sensitive Test for Identification of Major Pathogenes in Bovine Mastitis by PCR. Journal of Clinical Microbiology. Voll. 39-7. 2584_2589.
- 10-ZECCONI, A. (1996) - L'importanza del controllo delle mastiti per la produzione e la qualità del latte. Informatore Agrario, 36, 16-19.
- 11- Laboratory handbook on bovine mastitis (National Mastitis Council 1999)

FUNZIONALITA' EPATICA, RENALE E DEL SISTEMA IMMUNITARIO IN BROILER ALIMENTATI CON UNA DIETA CONTAMINATA CON 0,1 mg/kg DI OCRATOSSINA A

Salamano G.¹, Mellia E.¹, Pozzo L.², Schiavone A.², Tarantola M.², Gennero M. S.¹, Doglione L.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta - Torino

² Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia - Università di Torino

Key words: broiler, ochratoxin A, liver, kidney, immune system

ABSTRACT

Ochratoxin A (OTA) is a fungal secondary metabolite exhibiting nephrotoxic, immunosuppressive, teratogenic and carcinogenic properties. It is produced by a number of ubiquitous moulds of *Penicillium* and *Aspergillus* genera that contaminate agricultural commodities, either before harvest or during storage. This work aimed to evaluate the effects of a diet for broiler chickens contaminated with 0.1 mg OTA/kg (the maximum level suggested by the Commission Recommendation 2006/576/EC for poultry feed) on the liver and kidney functions and on the immune system.

INTRODUZIONE

La maggior parte dei prodotti alimentari di origine vegetale, in particolare i cereali, possono subire contaminazioni fungine durante ogni stadio del ciclo produttivo qualora si presentino le condizioni favorevoli alla loro crescita (elevata temperatura e umidità relativa). Lo sviluppo di questi microrganismi può avere implicazioni sia di tipo economico, con la riduzione della quantità e della qualità delle derrate, ma anche di tipo sanitario in seguito alla formazione di micotossine, metaboliti fungini secondari dotati di attività tossica. La diffusione della contaminazione da micotossine è stimata nella misura del 25% dei raccolti annuali di tutto il mondo (1). In qualità di contaminanti dei mangimi destinati agli animali "da reddito", le micotossine rappresentano un problema sanitario di primaria importanza per la loro pericolosità per la salute umana e animale. Per questo motivo sono stati imposti limiti normativi per la concentrazione di diverse tossine negli alimenti destinati al consumo umano e animale, in funzione della gravità degli effetti e della sensibilità delle specie. L'ocratossina A (OTA), prodotta da diverse specie di micromiceti del genere *Aspergillus* e *Penicillium*, è il metabolita fungino più frequentemente rinvenuto e presenta potenziale attività nefrotossica, epatotossica, teratogena, genotossica, cancerogena e immunosoppressiva (5).

La Commissione Europea, con la Raccomandazione 2006/576/CE, ha fissato nella misura di 0,1 mg/kg il contenuto massimo ammissibile di OTA nei mangimi (con umidità standard del 12%) destinati all'alimentazione del pollame. Obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare l'effetto di una dieta per broiler contaminata con OTA (alla dose massima consentita dalla Raccomandazione 2006/576/CE) sulla funzionalità epatica, renale e sul sistema immunitario.

MATERIALI E METODI

Un totale di 36 broiler maschi sono stati suddivisi casualmente in 2 gruppi sulla base della dieta somministrata, in modo da avere 3 repliche per ciascun tipo di dieta (n=6): gruppo C (controllo, alimentato con dieta basale); gruppo OTA (dieta basale + 0,1 mg OTA/kg s.s.). I broiler sono stati allevati per 35 giorni, dal giorno 1 al giorno 35. I prelievi ematici sono stati effettuati al termine del ciclo di allevamento. Il siero è stato

ottenuto per centrifugazione (10 min, 700 g); su questo sono state quantificate le concentrazioni degli enzimi epatici AST, ALT e dei metaboliti renali acido urico e creatinina utilizzando un fotometro per chimica clinica (Screen Master Touch, Hospitex Diagnostics). La separazione delle proteine sieriche (albumina e α , β , γ globuline) mediante elettroforesi su gel di agarosio è stata effettuata con lo strumento semi-automatico Hydrasis Sebia. Sono stati inoltre misurati il peso vivo dei broiler e, alla macellazione, il peso di fegato, milza, timo e borsa di Fabrizio. I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza utilizzando il trattamento alimentare come fonte di variazione.

RISULTATI

Il gruppo OTA presenta un decremento significativo delle proteine totali, albumina e globuline (α , β , γ) e un aumento del rapporto albumina/globuline (A/G); mentre la concentrazione sierica di AST, ALT acido urico e creatinina non presenta differenze rispetto al gruppo C (Tab. 1). Il peso vivo, il peso di fegato, milza e borsa di Fabrizio e timo al 35° giorno tendono a diminuire nel gruppo OTA rispetto al gruppo C, ma soltanto il peso del timo risulta significativamente minore (Tab. 2).

DISCUSSIONE

I livelli sierici delle proteine totali, nonché dell'albumina, sono da considerarsi indicatori sensibili per la valutazione dell'ocratossicosi nel pollo (6). La suscettibilità nei confronti dell'OTA varia a seconda della specie animale, della dose assunta, della durata dell'esposizione, dell'età, del sesso e dello stato fisiologico (8). In questo studio, il dosaggio massimo di OTA (0,1 mg/kg) consentito dalla Raccomandazione 2006/576/CE nei mangimi per avicoli ha determinato una minor sintesi di proteine a livello epatico e/o una probabile maggior escrezione a livello renale nei soggetti appartenenti al gruppo OTA. Nonostante ciò i dosaggi degli enzimi epatici e dei metaboliti renali risultano sovrapponibili a quelli del gruppo di controllo: considerando che nel pollo la tossicità orale acuta (espressa come dose letale LD₅₀) è 3,3 mg/kg di peso vivo (7), probabilmente il dosaggio di OTA non è stato tale da indurre ulteriori scompensi a livello epatico e renale. Diversi studi hanno evidenziato che nei polli, oltre ai reni e al fegato, possono essere colpiti dall'azione tossica dell'OTA anche gli organi linfoidi (quali timo, Borsa di Fabrizio, milza e placche del Peyer) in cui l'OTA determina una regressione della popolazione linfocitaria (2,4); inoltre è stato osservato che l'esposizione all'OTA interferisce con i livelli plasmatici delle immunoglobuline (3,4). In questo studio il peso del timo, così come il livello di gamma globuline, è significativamente minore nel gruppo OTA rispetto al gruppo di controllo: anche ad un dosaggio di 0,1 mg/kg l'OTA ha determinato un effetto depressivo sia sull'immunità umorale che cellulo-mediata, predisponendo i broiler all'insorgenza di malattie e patologie condizionate.

BIBLIOGRAFIA

1. Akande K.E., Abubakar M.M., Adegbola T.A., Bogoro S.E. (2006) Nutritional and health implications of mycotoxins in animal feeds: A review. *Pak. J. Nutr.* 5: 398-403.
2. Burns R.P. & Divedi P. (1986) The natural occurrence of ochratoxin A and its effects in poultry. A review - Part II. Pathology and immunology. *World's Poult. Sci. J.* 42: 48-62.
3. Dortant P.M., Peters-Volleberg G.W.M., Van Loveren H., Marquardt R.R., Speijers G.J.A. (2011) Age-related differences in the toxicity of ochratoxin A in female rats. *Food Chem. Toxicol.* 39: 55-65.
4. Dwivedi P. & Burns R.B. (1984) Pathology of ochratoxin A in young broiler chicks. *Res. Vet. Sci.* 36: 92-103.
5. Fink-Gremmels J. (1999) Mycotoxins: their implications for human and animal health. *Veterinary Quarterly* 21: 115-120.
6. Huff, W.E., Kubena L.F., Harvey R.B. (1988) Progression of ochratoxicosis in broiler chickens. *Poult. Sci.*, 67: 1139-1146.
7. Kuiper-Goodman T., Scott P.M. (1989) Risk assessment of the mycotoxin Ochratoxin A. *Biomed. Environ. Sci.* 2:179.
8. O'Brien E. & Dietrich D.R. (2005) Ochratoxin A: the continuing enigma. *Critical Rev. Toxicol.* 35: 33-60.W

Tabella 1 - Proteine totali, profilo elettroforetico (albumina e globuline α , β , γ), rapporto A/G¹, enzimi epatici (AST² e ALT³) e metaboliti renali (acido urico e creatinina) dei broiler del gruppo di controllo (alimentato con dieta basale) e del gruppo OTA (alimentato con dieta basale + 0,1 mg OTA/kg)

	Controllo	OTA (0,1 mg/kg)	p
proteine totali (g/dl)	3,88 ± 0,80	2,64 ± 0,90	< 0,01
albumina (g/dl)	1,43 ± 0,31	1,04 ± 0,25	< 0,01
α globulina (g/dl)	1,00 ± 0,22	0,74 ± 0,21	< 0,05
β globulina (g/dl)	0,60 ± 0,18	0,35 ± 0,12	0,001
γ globulina (g/dl)	0,81 ± 0,17	0,55 ± 0,15	0,001
A/G ¹	0,59 ± 0,04	0,64 ± 0,04	< 0,05
AST ² (UI/l)	170 ± 19,8	167 ± 30,7	n.s.
ALT ³ (UI/l)	6,04 ± 1,96	6,20 ± 1,40	n.s.
acido urico (mg/dl)	15,6 ± 2,00	15,3 ± 2,43	n.s.
creatinina (mg/dl)	0,39 ± 0,03	0,37 ± 0,02	n.s.

¹ albumina/globulina; ² aspartato-aminotransferasi; ³ alanina-aminotransferasi

Tabella 2 - Peso vivo e peso di fegato, milza, borsa di Fabrizio e timo al 35° giorno (media ± d.s.) dei broiler del gruppo di controllo (alimentato con dieta basale) e del gruppo OTA (alimentato con dieta basale + 0,1 mg OTA/kg)

	Controllo	OTA (0,1 mg/kg)	p
peso vivo (g)	1950 ± 353	1872 ± 309	n.s.
fegato (g)	51,79 ± 7,33	50,92 ± 7,83	n.s.
milza (g)	3,04 ± 0,89	2,41 ± 0,58	n.s.
borsa di Fabrizio (g)	3,19 ± 1,07	2,86 ± 1,25	n.s.
timo (g)	10,34 ± 1,86	7,68 ± 1,91	< 0,05

IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* PRODUTTORI DI β -LATTAMASI ISOLATI DA CANI E GATTI CON CISTITE NELLA PROVINCIA DI TORINO

Salvarani S., Tramuta C., Nebbia P., Robino P.

¹Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia, FMV, Università degli Studi di Torino;

Key words: *Escherichia coli*, β -lattamasi, urine

ABSTRACT

In this study we determined the carriage of β -lactamase genes in 59 *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats with cystitis in the Turin area (Italy). Positives strains were tested by antimicrobial susceptibility test and characterized for virulence factors and phylogenetic background. A total of 24 (40.7%) *E. coli* strains carried at least one β -lactamase gene and 18.6% were "Extended-Spectrum β -Lactamases" (ESBLs). All positives strains showed phenotypic resistance to several antimicrobials and a wide range of virulence factors was found. The phylogenetic analysis showed that the strains belonged mainly to group B2.

INTRODUZIONE

Il numero di varianti di *E. coli* in grado di produrre enzimi che idrolizzano ed inattivano gli antibiotici β -lattamici è in continuo aumento da quando nel 1983 fu dimostrata la presenza di enzimi β -lattamasi a spettro allargato (ESBL). Ad oggi si conoscono più di 150 geni di resistenza, appartenenti principalmente alle famiglie TEM, SHV, OXA, CTX-M, e AmpC. Le ESBL includono mutanti di TEM e SHV, tipi CTX-M e altri meno conosciuti (es. OXA, VER, PER). Ceppi ESBL diffondono non solo nell'uomo, soprattutto in pazienti ospedalizzati, ma anche negli animali. In Italia non sono numerosi i dati sulla diffusione in campo veterinario, pertanto abbiamo ritenuto interessante effettuare un'indagine per rilevare la presenza di geni che codificano per ESBL e altre β -lattamasi in ceppi di *E. coli* isolati da urine di cani e gatti con cistite che vivono nella provincia di Torino. I ceppi sono stati ulteriormente caratterizzati analizzando i *patterns* di antibiotico-resistenza, la presenza di fattori di virulenza, il filogruppo di appartenenza.

MATERIALI E METODI

Ceppi batterici

In questo studio sono stati testati 59 ceppi di *E. coli* isolati da urine di cani (n=44) e gatti (n=15) con cistite presso ambulatori veterinari di Torino e provincia. I campioni di urina sono stati prelevati mediante cistocentesi e sottoposti ad esame culturale.

Ricerca di geni β -lattamasi

In tutti i ceppi sono stati cercati con metodiche PCR i geni che codificano per *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CMY2} (5, 6), gene di frequente riscontro nel gruppo eterogeneo AmpC. Gli ampliconi ottenuti sono stati purificati e sequenziati. Le sequenze ottenute sono state inserite nel sistema di ricerca BLAST e messe a confronto con quelle già presenti nelle banche dati del sistema di ricerca.

Caratterizzazione dei ceppi

Gli isolati produttori di β -lattamasi sono stati testati mediante metodo della disco-diffusione in gel di agar (Kirby-Bauer) per valutare il profilo di antibiotico-resistenza per 9 antibiotici: gentamicina (GM 10 μ g), cefoperazone (CFP 75 μ g), cefovecina (CVN 30 μ g), cefalexina (CF 30 μ g), amoxicillina-acido clavulanico (AMC 30 μ g), nitrofurantoina (NT 50 μ g), enrofloxacin (ENO 5 μ g), piperacillina (PIP 100 μ g), sulfamonometil (SXT 25 μ g), seguendo le linee guida dell'NCCLS per l'interpretazione degli aloni di inibizione.

Sono stati ricercati 14 fattori di virulenza mediante PCR: *afa*, *papC*, *sfa*, *iutA*, *fimA*, *hlyA*, *cnf1*, *cdt*, *hlyA*, *traT*, *fyuA*, *KpsMII*, *clbB* e *malX* (8, 10); inoltre, tramite multiplex PCR, ciascun isolato è stato assegnato ad uno dei 4 principali gruppi filogenetici (A, B1, B2 o D) in cui vengono suddivisi gli stipti di *E. coli* (3).

RISULTATI

Su 59 ceppi di *E. coli* sono risultati positivi a uno o più geni β -lattamasi 24 campioni (40.7%), come riportato nella Tabella 1, di cui 9 (15.2%) associati ad almeno altri 2 geni di resistenza. In 2 ceppi è stato possibile evidenziare la presenza simultanea di 3 geni.

Tabella 1 – Distribuzione di *E. coli* positivi a ESBL e altre β -lattamasi isolati da urine di cani e gatti con cistite.

	Tipi di geni β -lattamasi	N. di isolati (%)	
		n. isolati da cani	n. isolati da gatti
ESBL positivi	<i>bla</i> CTX-M	1 (2.3%)	4 (26.7%)
	<i>bla</i> CTX-M+ <i>bla</i> CMY-2	1 (2.3%)	2 (13.3%)
	<i>bla</i> CTX-M+ <i>bla</i> TEM	1 (2.3%)	-
	<i>bla</i> CTX-M+ <i>bla</i> TEM+ <i>bla</i> CMY-2	1 (2.3%)	1 (6.7%)
ESBL negativi	<i>bla</i> TEM	4 (9.1%)	-
	<i>bla</i> TEM+ <i>bla</i> CMY-2	3 (6.8%)	-
	<i>bla</i> SHV	1 (2.3%)	-
	<i>bla</i> CMY-2	4 (9.1%)	1 (6.7%)
		16 (36.4%)	8 (53.3%)

Il sequenziamento dei ceppi positivi a *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} ha evidenziato la presenza della variante TEM-1 in tutti gli isolati e SHV-1 nel ceppo positivo a *bla*_{SHV}. Tra i geni tipo CTX-M al momento sono stati identificati 5 su 11 ceppi positivi, 3 appartenenti al gruppo CTX-M1 (2 al sottogruppo CTX-M14 e 1 a CTX-M1) e 2 ceppi al gruppo CTX-M9 (sottogruppo CTX-M14). Fra i 24 ceppi produttori di β -lattamasi 11 (18.6% sul totale) sono risultati produttori di enzimi ESBL, positivi al gene *bla*_{CTX-M}, sia da solo che associato ad altri geni di resistenza. La caratterizzazione di questi isolati è riportata in Tabella 2.

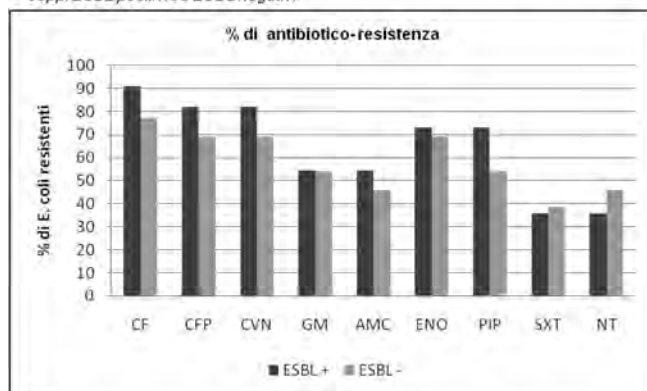
Sul totale dei ceppi produttori di β -lattamasi l'84% dei campioni ha mostrato resistenza a cefalexina, il 75% a cefoperazone e cefovecina, il 63,5% a piperacillina, il 50% a inibitori delle β -lattamasi (amoxicillina-acido clavulanico), il 71% ad enrofloxacin, il 54% a gentamicina, il 41% a nitrofurantoina e il 37% a sulfamonometil. Il 92% degli isolati ha mostrato resistenza ad almeno tre antibiotici e sono stati considerati ceppi multi-resistenti (MDR). Non abbiamo osservato differenze rilevanti nei profili di antibiotico-resistenza fra ceppi ESBL-positivi ed ESBL-negativi (Figura 1).

In tutti i ceppi sono stati evidenziati geni di virulenza, da un minimo di 2 fattori ad un massimo di 10. Nella Figura 2 sono riportati i risultati suddivisi per gruppi ESBL-positivi ed ESBL-negativi.

I ceppi appartenevano prevalentemente al filogruppo B2 (54,2%), con una prevalenza maggiore negli ESBL-positivi, in minor misura al gruppo B1 (20.8%), A (16.7%) e D (8.3%).

Tabella 2- Distribuzione di geni bla e profili di antibiotico-resistenza di 11 *E. coli* produttori di β -lattamasi in isolati urinari da cane e gatto

Tipi di ESBL	n. di isolati	n. di isolati in combinazione con			% di resistenza verso								
		blaTEM-1	blaSHV-1	blaCMY-2	CF	CFP	CVN	GM	AMC	ENO	PIP	SXT	NT
blaCTX-M	5	-	-	-	80	80	60	40	40	40	80	20	40
blaCTX-M	1	1	-	-	100	100	100	0	100	100	0	100	100
blaCTX-M	3	-	-	3	100	100	100	67	67	100	100	33	33
blaCTX-M	2	2	-	2	100	50	100	100	50	100	50	50	0

Figura 1 - % di antibiotico-resistenza in *E. coli* produttori di β -lattamasi suddivisi in ceppi ESBL positivi ed ESBL negativiFigura 2 - presenza di fattori di virulenza (VF) in *E. coli* produttori di β -lattamasi suddivisi in ceppi ESBL positivi ed ESBL negativi

DISCUSSIONE

Gli enterobatteri produttori di β -lattamasi sono diffusi a livello mondiale, anche se in modo disomogeneo. I dati relativi all'infezione nell'uomo evidenziano prevalenze in Europa che oscillano tra il 2 e il 30% (4). Per quanto riguarda il campo veterinario sono stati identificati in diverse specie animali compresi cani e gatti (2, 9). Negli ultimi anni, in particolare, si è evidenziato un aumento di segnalazioni di *E. coli* produttori di ESBL tipo CTX-M.

Questo studio evidenzia un'elevata diffusione di *E. coli* produttori di β -lattamasi nelle urine di cani e gatti con cistite, compresi ceppi ESBL. Questi ceppi sono in gran parte multi-resistenti, possiedono numerosi fattori di virulenza e appartengono in elevata percentuale al filogruppo B2, tipico dei ceppi che causano infezioni urinarie.

Un dato interessante è il ritrovamento di *E. coli* ESBL tipo CTX-M, in particolare nei ceppi provenienti da gatti con cistite (87% di positività). Il trattamento di queste infezioni non è di semplice risoluzione, in quanto frequentemente questi isolati non rispondono all'uso di cefalosporine di III generazione (7). E' anche dimostrato che i ceppi produttori di β -lattamasi spesso portano la resistenza ai chinoloni (1), fenomeno osservato anche nel nostro studio.

I nostri dati confermano che gli isolati produttori di ESBL presentano frequentemente una resistenza multipla agli antibiotici che ne rende particolarmente difficoltoso il trattamento. Un problema da non sottovalutare è la possibilità di avere nello stesso ceppo associazioni di β -lattamasi, questo tende sicuramente a influire sulla scelta della terapia antibiotica da parte del medico.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Bouchakour M., Zerouali K., Gros Claude J.D., Amarouch H., El Mdaghri N., Courvalin P., Timouni M. 2010. Plasmid-mediated quinolone resistance in expanded spectrum beta lactamase producing enterobacteriaceae in Morocco. J Infect Dev Ctries. 23, 779-803.
- Cerquetti M., Giufrè M., García-Fernández A., Accogli M., Fortini D., Luzzi I., Carattoli A. 2010. Ciprofloxacin-resistant, CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST131 clone in extraintestinal infections in Italy. Clin Microbiol Infect. 16, 55-58.
- Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. 2000. Rapid and simple determination of the *E. coli* phylogenetic group. Appl Environ Microbiol. 66, 4555-4558.
- Grandesso S., Sapino B., Mazzucato S., Alessandrini R., Solinas M., Gion M. 2010. Study on in-vitro susceptibility of ESBL-positive *Escherichia coli* isolated from urine specimens. Infez Med. 18, 162-168.
- Hasman H., Mevius D., Veldman K., Olesen I., Aarestrup FM. 2005. Beta-Lactamases among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. J Antimicrob Chemother. 56, 115-121.
- Jiang X., Ni Y., Jiang Y., Yuan F., Han L., Li M., Liu H., Yang L., Lu Y. 2005. Outbreak of infection caused by *Enterobacter cloacae* producing the novel VEB-3 beta-lactamase in China. J Clin Microbiol. 43, 826-831.
- Livmore DM. 2008. Defining an extended-spectrum beta-lactamase. Clin Microbiol Infect. 14, 3-10.
- Moreno E., Planells I., Prats G., Planes A.M., Moreno G., Andreu A. 2005. Comparative study of *Escherichia coli* virulence determinants in strains causing urinary tract bacteremia versus strains causing pyelonephritis and other sources of bacteremia. Diagn Microbiol Infect Dis. 53, 93-99.
- Moreno A., Bello H., Guggiana D., Domínguez M., González G. 2008. Extended-spectrum beta-lactamases belonging to CTX-M group produced by *Escherichia coli* strains isolated from companion animals treated with enrofloxacin. Vet Microbiol. 25, 203-208.
- Moulin-Schouleur M., Rèperant M., Laurent S., Brée A., Mignon-Grasteau S., Germon P., Rasschaert D., Schouleur C. 2007. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: Link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. J Clin Microbiol. 45, 3366-3376.

INDAGINE DI BENESSERE ORGANIZZATIVO: STRUMENTO DI CAMBIAMENTO

Sarrecchia E., Bozzano A. I.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana
Via Appia Nuova, 1411 - Roma

Key words: Benessere Organizzativo, Clima organizzativo, Pubblica Amministrazione

ABSTRACT

A study of organizational well-being was carried out at Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana. By means of an anonymous questionnaire the workers expressed their personal degree of well-being.

On the basis of the investigation results some improvement programs have been achieved.

INTRODUZIONE

Nell'ultimo decennio è aumentata l'attenzione nei confronti del benessere dei lavoratori all'interno delle organizzazioni. È stato coniato il termine di "benessere organizzativo", inteso come la capacità di un'organizzazione di sviluppare e mantenere il benessere fisico, psicologico e sociale delle persone che in essa lavorano (1). Si ritiene che per lo sviluppo e l'efficienza delle amministrazioni, le condizioni emotive dell'ambiente in cui si lavora, la sussistenza di un clima organizzativo che stimoli la creatività e l'apprendimento, la sicurezza degli ambienti di lavoro, costituiscano alcuni degli elementi di fondamentale importanza ai fini del funzionamento delle stesse (1,2)

L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana (IZSLT) ha condotto un'indagine sul Benessere Organizzativo del personale di laboratorio e degli uffici amministrativi, allo scopo di individuare aree di benessere e malessere percepito dai lavoratori, individuare eventuali elementi critici e strutturare percorsi di miglioramento.

MATERIALI E METODI

La realizzazione dell'indagine è stata curata dal personale dell'Ufficio di Staff Formazione, Comunicazione e Documentazione e della Direzione aziendale dell'IZSLT.

La Direzione ha sostenuto l'iniziativa sin dalle fasi iniziali.

Sono stati utilizzati la metodologia e gli strumenti messi a disposizione a livello nazionale dal Dipartimento della Funzione Pubblica ("Programma Cantieri"), in collaborazione con la Facoltà di Psicologia 2 dell'Università "La Sapienza" di Roma (2). Il Programma Cantieri, nato per promuovere l'innovazione nella PA, ha proposto alle pubbliche amministrazioni italiane la realizzazione di diverse iniziative (bilancio sociale, indagini di customer satisfaction, codice etico, ecc.) tra cui uno studio di benessere organizzativo.

L'indagine è stata effettuata nel 2008 su tutto il personale dell'IZS Lazio e Toscana, appartenente sia alla dirigenza che al comparto, sia al settore tecnico-sanitario che amministrativo, con ogni tipologia di contratto, per un totale di 403 partecipanti. Il progetto è stato promosso e divulgato in maniera capillare da due mesi prima dell'avvio dell'indagine.

Lo strumento di rilevazione dati è stato il questionario redatto dallo stesso Gruppo Cantieri e dalla Facoltà di Psicologia 2 della Sapienza, composto da 66 domande organizzate in sezioni che indagano in dettaglio 14 dimensioni, 11 indicatori di benessere e 15 di malessere, di seguito riportati (4).

Le dimensioni del benessere organizzativo indagate dal questionario sono le seguenti (4):

- 1) Ambiente di lavoro salubre, confortevole e accogliente
- 2) Obiettivi espliciti e chiari
- 3) Valorizzare le competenze
- 4) Ascoltare le istanze dei dipendenti
- 5) Mettere a disposizione di tutti le informazioni inerenti il lavoro e la vita lavorativa
- 6) Adottare azioni adeguate per prevenire gli infortuni
- 7) Stimolare un ambiente relazionale, promuovendo la comunicazione e le relazioni interpersonali
- 8) Assicurare scorrevolezza operativa, supportare l'azione verso gli obiettivi delineati
- 9) Assicurare equità di trattamento, sia dal punto di vista retributivo, che di assegnazione di compiti e responsabilità
- 10) Stimolare nei dipendenti un senso di utilità sociale
- 11) Apertura all'innovazione tecnologica
- 12) Prestare attenzione ai fattori di stress
- 13) Attenzione alla conflittualità
- 14) Attenzione al contenuto e al carico di lavoro del singolo

Indicatori di benessere (4):

- 1) Soddisfazione per l'organizzazione
- 2) Voglia di impegnarsi per l'organizzazione
- 3) Sensazione di far parte di un team
- 4) Voglia di andare a lavoro
- 5) Elevato coinvolgimento
- 6) Speranza di poter cambiare le condizioni negative presenti
- 7) Percezione di successo dell'organizzazione
- 8) Giusto equilibrio tra vita lavorativa e privata
- 9) Relazioni interpersonali sul posto di lavoro
- 10) Valori organizzativi
- 11) Immagine del management

Indicatori di malessere (4):

- 1) Insofferenza nell'andare a lavoro
- 2) Assenteismo
- 3) Disinteresse per il lavoro
- 4) Desiderio di cambiare lavoro
- 5) Alto livello di pettegolezzo
- 6) Covare risentimento verso l'organizzazione
- 7) Aggressività inabituale e nervosismo
- 8) Disturbi psicosomatici
- 9) Sentimento di inutilità
- 10) Sentimento di irrilevanza
- 11) Sentimento di disconoscimento
- 12) Lentezza nella performance
- 13) Confusione organizzativa
- 14) Venir meno della propositività a livello cognitivo
- 15) Aderenza formale alle regole e anaffettività lavorativa

Una sezione finale del questionario presenta una lista di possibili suggerimenti per attuare dei miglioramenti nell'azienda. Inoltre, nell'indagine effettuata presso l'IZS Lazio e Toscana, è stato aggiunto uno spazio libero finale nel quale ogni partecipante ha potuto esprimere proposte di intervento sulle criticità segnalate. La compilazione dei questionari è avvenuta a

titolo esclusivamente anonimo. Al fine di ottenere il maggior numero di questionari compilati, ed evitare il fenomeno della dispersione, il personale della sede centrale dell'Istituto è stato invitato in gruppi presso la Sala Conferenze, mentre i responsabili dell'indagine si sono recati nelle sezioni territoriali dell'Istituto, per permettere ai dipendenti delle sedi periferiche di poter compilare il questionario senza spostarsi. I questionari sono stati elaborati tramite un apposito software messo a disposizione dallo stesso Programma Cantieri, che restituisce i risultati sotto forma di grafici, successivamente interpretati con l'ausilio delle chiavi di lettura fornite dal programma (4).

RISULTATI

Sono stati raccolti 365 questionari su 403 distribuiti, per un valore percentuale di 90,6%. I punti di forza della vita lavorativa nell'Ente risultano essere: la soddisfazione per le relazioni interpersonali sul lavoro a livello orizzontale (tra colleghi), che registra il valore più alto; la capacità d'ascolto reciproco e la percezione d'utilità del proprio lavoro, riconosciuti dal personale sia della sede centrale che delle Sezioni territoriali. Dallo studio emergono anche alcune criticità. In particolare, sono state evidenziate quattro aree di miglioramento: valorizzazione del personale, con il 19% di segnalazioni; circolazione delle informazioni e maggior chiarezza degli obiettivi, entrambe con il 10%; rapporto con i superiori con il 6%. Si evidenziano alcune differenze nella percezione del benessere tra i dirigenti e il comparto, soprattutto in riferimento alla valorizzazione del personale e all'equità di trattamento, elementi critici soprattutto per il personale del comparto; mentre entrambe le categorie considerano positivi l'ascolto, la qualità delle relazioni tra colleghi e l'utilità del proprio lavoro. Non si evidenziano differenze significative tra i lavoratori del profilo tecnico-sanitario ed amministrativo.

Le possibili azioni di miglioramento delle aree critiche riscontrate sono state individuate durante incontri seminariali con i partecipanti che, suddivisi in sottogruppi, hanno esaminato le quattro principali aree problematiche; per ciascuna di esse hanno analizzato le possibili cause e proposto ipotesi di soluzione. L'insieme delle analisi e dei suggerimenti sono stati raccolti in un Report redatto dalla Struttura Formazione, Comunicazione e Documentazione dell'IZS, reso pubblico nel sito istituzionale e consegnato alla direzione aziendale. Tra le proposte di miglioramento troviamo: sviluppo manageriale della dirigenza; maggior definizione dei profili di ruolo, di compiti e responsabilità; maggior utilizzo delle riunioni per migliorare la comunicazione e il coinvolgimento; applicazione del sistema di valutazione delle performance; implementazione del portale dell'Istituto come strumento comunicativo interno. A seguito di questa ricerca è stata realizzata nel 2010 un'indagine di clima organizzativo con l'assistenza della Scuola Sant'Anna di Pisa, nell'ambito di un progetto di misurazione e valutazione delle performance condotto insieme all'IZS Umbria e Marche. Gli esiti scaturiti dalla seconda ricerca sono in buona parte sovrapponibili ai primi e, a partire dall'insieme di tutti i risultati, sono stati progettati interventi di miglioramento. Nello specifico, è stato realizzato nel 2010 un percorso formativo su "Strategie

manageriali per consolidare la governabilità del sistema I.Z.S. Lazio e Toscana" che ha coinvolto 150 dipendenti, al fine di promuovere e rafforzare le competenze gestionali e favorire l'applicazione del sistema di valutazione delle performance; sono state potenziate le riunioni di unità operativa, con una maggior coinvolgimento del personale nella definizione degli obiettivi; sono state avviate, anche in relazione all'applicazione della normativa vigente sulla sicurezza sul lavoro, iniziative di studio dello stress lavoro-correlato in collaborazione con uno psicologo. Diverse iniziative sono in programma per il biennio 2011 e 2012, tra cui l'applicazione di un sistema di valorizzazione delle prestazioni del personale, la piena applicazione della valutazione delle performance, la valutazione delle competenze trasversali (soft skills) dei dirigenti, la realizzazione di una conferenza dei servizi per promuovere la comunicazione interna, l'effettuazione di eventi che permettano lo scambio e il confronto tra le diverse strutture dell'Ente.

DISCUSSIONE

La percentuale di risposta al questionario è stata elevata (90,6%), a vantaggio della rappresentatività dei risultati. La modalità di promozione dell'iniziativa tra il personale, l'avvallo e il coinvolgimento della direzione aziendale e le modalità di somministrazione dei questionari sono da ritenersi alla base di questo risultato. Il coinvolgimento diretto del personale, anche nella proposta di azioni di miglioramento tramite i gruppi di lavoro, ha fornito utili spunti, oltre che far sentire le persone più partecipi.

Dall'esperienza condotta, si ritiene che la realizzazione di indagini di benessere organizzativo sia un valido strumento per rilevare la condizione lavorativa dei dipendenti e per migliorare le performance dell'organizzazione stessa. Fattori importanti per la riuscita di tali iniziative sono: coinvolgimento attivo della direzione aziendale; adeguata promozione dell'indagine; tutela dell'anonimato dei partecipanti allo studio; attivazione di interventi di miglioramento in base ai risultati emersi. E' inoltre auspicabile proseguire il monitoraggio del grado di benessere dell'organizzazione nel tempo.

BIBLIOGRAFIA

1. Avallone F., Bonaretti M. (a cura di), 2003. Benessere organizzativo. Per migliorare la qualità del lavoro nelle amministrazioni pubbliche. Soveria Mannelli, Rubettino;
2. Bonaretti M., Testa P. (a cura di), 2003. Persone al lavoro. Politiche e pratiche per il benessere organizzativo nelle pubbliche amministrazioni. Soveria Mannelli, Rubettino.
3. Pellizzoni B. (a cura di), 2005. Amministrazioni alla ricerca del benessere organizzativo. Esperienze di analisi del clima organizzativo nelle amministrazioni pubbliche. Edizioni Scientifiche Italiane.
4. Pellizzoni B. (a cura di), Kit benessere organizzativo. Guida alla sperimentazione

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI *Pasteurella multocida* ISOLATI IN CORSO DI PASTEURELLOSI DA DIVERSE SPECIE ANIMALI

Sebastiani C.¹, Ortenzi R.¹, Biagetti M.¹, Mangili P.¹, Bano L.³, Luppi A.², Cucco L.¹, Magistrati C. F.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche (IZSUM) – Perugia

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna (IZSLER)- Sezione di Reggio Emilia

³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVE)- Sezione di Treviso

Keywords: *Pasteurella multocida*, PCR, tipizzazione

INTRODUZIONE

Pasteurella multocida è commensale delle prime vie respiratorie di molte specie animali, ma è anche agente causale di forme morbose quali la setticemia emorragica del bovino, la broncopneumonia enzoootica del bovino e dell'ovino, la polmonite e la rinite atrofica del suino, il colera aviario, la rinite del coniglio, del cane e del gatto, la mastite, la polmonite, la piodermite e la pasteurellosi setticemica del coniglio (3). La pasteurellosi nelle sue diverse espressioni cliniche si riscontra con frequenza negli allevamenti intensivi provocando ingenti danni economici diretti e indiretti. Mediante prove d'inibizione dell'emoagglutinazione sono stati individuati 5 sierotipi capsulari di *P. multocida* (A, B, D, E, F), ciascuno associato, anche se non in senso esclusivo, ad un ospite specifico (6). Esiste una correlazione tra il sierotipo capsulare e la patologia riscontrata; infatti, ai sierotipi A e F sono più frequentemente associate malattie respiratorie e colera aviario, ai sierotipi B e E si associa generalmente la setticemia emorragica dei ruminanti e il sierotipo D è abitualmente isolato in caso di rinite atrofica del suino (4).

La patogenicità di *P. multocida* si è dimostrata essere legata sia alla presenza della capsula (4), che a quella dei fattori di virulenza (7). Sebbene siano state osservate associazioni significative tra alcune malattie e l'espressione di specifiche tossine (tossine *tbpA* e *hgbB* nelle malattie del bovino, dermonecrotossina *toxA* nelle malattie del suino) (2), risultano ancora poche le informazioni disponibili in letteratura circa l'epidemiologia e l'importanza delle infezioni causate da *P. multocida*.

Scopo del presente lavoro è stato quello di descrivere la distribuzione dei vari sierotipi e tossinotipi di ceppi di *P. multocida* isolati in corso di pasteurellosi da diverse specie animali. Questo obiettivo è stato perseguito mediante l'applicazione di due protocolli di PCR multiplex diretti ai geni codificanti per gli antigeni capsulari e per alcuni fattori di virulenza.

MATERIALI E METODI

Cepi batterici. Sono stati testati 195 ceppi di *P. multocida* di origine diversa (bovino 39, ovino 20, suino 40, lagomorfi 89, gatto 3, equino 1, tacchino 1, lepri 2), collezionati dal 2004 al 2011 nell'ambito dell'attività diagnostica dell'IZSUM e di altri Istituti Zooprofilattici. I ceppi, conservati alla temperatura di -80°C, sono stati inoculati in Brain Heart Infusion (BHI) e incubati a 37°C per 24 ore; 10 µL della sospensione ottenuta sono stati trasferiti in Agar Sangue (5% globuli rossi di montone) per ottenere, dopo 24 ore di incubazione a 37°C, delle colonie isolate.

PCR multiplex. I 195 ceppi isolati di *P. multocida* sono stati analizzati tramite due protocolli di PCR multiplex per la tipizzazione degli antigeni capsulari e la ricerca di alcuni geni di virulenza (Tab. 1).

Tab.1 descrizione dei fattori di virulenza

Fattori di virulenza	Descrizione
<i>hgbB</i>	Hemoglobin binding protein
<i>pfhA</i>	Filamentous hemagglutinin
<i>tbpA</i>	Transferrin binding protein
<i>toxA</i>	Dermonecrotic toxin

I protocolli di PCR multiplex descritti in letteratura (1, 5) sono stati sottoposti ad un'ulteriore messa a punto volta al bilanciamento delle coppie di primer utilizzate. E' stato pertanto necessario analizzare inizialmente alcuni ceppi di riferimento per i quali era noto il tipo capsulare (NTCT 12178 capD-toxA, NTCT 10322 capA, NTCT 3195 capB, NTCT 10722 capA).

Le colture batteriche sono state lisate per bollitura ed analizzate tramite PCR.

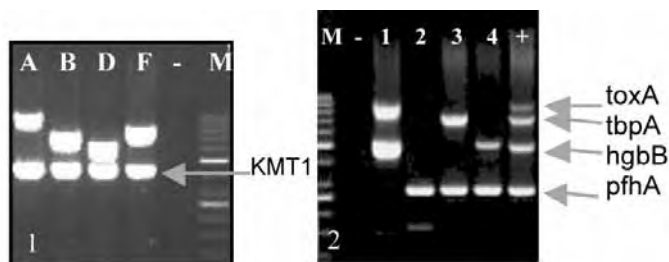
La PCR per gli antigeni capsulari utilizza cinque coppie di primer specifiche per ciascun tipo capsulare ed include anche una coppia di primer specie-specifici (KMT1) per confermare l'identificazione di specie (Fig. 1).

Per la ricerca dei geni codificanti per i fattori di virulenza è stata utilizzata una PCR multiplex avente come target i geni *toxA*, *tbpA*, *hgbB* e *pfhA* (Fig.2).

Per la PCR multiplex "Antigeni capsulari" 1 µL di ciascuna bollitura è stato aggiunto ad una mix (25 µL) contenente dNTPs 0.2 mM, coppie di primers (0.28-4.8 µM), 4 µL di 5X PCR Buffer, MgCl₂ 2mM, 1 U GoTaqFlexi DNA Polymerase (Promega). Per la PCR multiplex "Geni di virulenza" 4 µL di ciascuna bollitura sono stati aggiunti ad una mix (50 µL) contenente dNTPs 0.2 mM, coppie di primers (0.2-1.6 µM), 7 µL di 5X PCR Buffer, MgCl₂ 1.5 mM, 1 U GoTaqFlexi DNA Polymerase (Promega). I prodotti di amplificazione sono stati separati tramite elettroforesi su gel d'agarosio al 2%.

Fig. 1: PCR Multiplex "Antigeni capsulari"

Fig. 2: PCR Multiplex "Geni di virulenza"



RISULTATI E DISCUSSIONE

I protocolli utilizzati per la tipizzazione molecolare di *P. multocida* si sono dimostrati in grado di identificare correttamente il tipo capsulare, ed i geni codificanti per i fattori di virulenza nei

campioni analizzati, offrendo un metodo rapido ed alternativo ai test fenotipici.

Nella popolazione in esame è stata riscontrata la presenza di tutti gli antigeni capsulari ad eccezione del tipo E che, come riportato in letteratura, è stato isolato nel solo continente africano (2). Osservando la distribuzione dei tipi capsulari per ogni specie, si può rilevare che il tipo A è quello più ampiamente rappresentato in tutte le specie.

Nella popolazione bovina, prevalentemente costituita da ceppi isolati in corso di forme respiratorie, l'unico sierotipo riscontrato è stato il tipo A (Tab.2), per lo più associato alla combinazione dei geni di virulenza pfhA e tbpA (82%, Tab.3).

I ceppi di origine suina sono stati isolati principalmente da polmoniti; ancora una volta il sierotipo A è stato quello più frequentemente identificato (Tab. 2), in questo caso associato ai geni pfhA o hgbB (Tab. 3). Solo il 20% dei campioni provenienti da suini sono risultati essere di tipo D, associati con il gene hgbB. I ceppi esaminati non provenivano da casi di rinite atrofica progressiva, e questo può giustificare il basso numero di isolati appartenenti al sierotipo D e tossinotipo toxA, rispetto a quanto riportato in letteratura per la specie suina (2,3).

Nei campioni di origine ovina, prevalentemente per lo più provenienti da forme respiratorie, il tipo capsulare più rappresentato è stato il tipo A in associazione con tbpA+toxA o tbpA+pfhA (Tab.2, Tab.3). E' interessante notare come, nei pochi casi di mastite da noi esaminati, il profilo riscontrato sia stato il medesimo.

Per quanto concerne i risultati ottenuti dall'analisi dei ceppi di provenienza conicola, si è osservata un'ampia variabilità dei dati ottenuti. Sono rappresentati infatti tutti i tipi capsulari ad eccezione dell'E, con una prevalenza del tipo A e del tipo F (Tab.2). Nelle forme respiratorie si riscontrano prevalentemente i tossinotipi pfhA e hgbB, mentre solo negli stipiti di origine polmonare sono stati riscontrati entrambi questi due geni. Nelle forme setticemiche predomina il gene pfhA e nelle forme riproduttive il gene hgbB.

Tab.2 Tipo capsulare riscontrato in ogni specie (tra parentesi i valori in percentuale)

	bovino	suino	ovino	coniglio
Tipo A	39 (100)	32 (80)	17 (85)	52 (58)
Tipo B	/	/	/	1 (1)
Tipo D	/	8 (20)	2 (10)	14 (16)
Tipo F	/	/	1 (5)	22 (25)
totale	39	40	20	89

Tab.3 Geni codificanti per fattori di virulenza riscontrati in ciascuna specie (tra parentesi i valori in percentuale)

	bovino	coniglio	suino	ovino	Altri
hgbB	4 (10)	43 (49)	24(60)	6 (30)	4(57)
pfhA	1 (3)	35 (39)	15(38)	/	/
pfhA+tbpA	32(82)	1 (1)	/	4 (20)	/
tbpA	2 (5)	/	/	/	/
pfhA+hgbB	/	7 (8)	1 (2)	/	3(43)
tbpA+toxA	/	/	/	10(50)	/
No fatt. vir.	/	3 (3)	/	/	/
totale	39	89	40	20	7

Tab. 4 Provenienza dei ceppi per specie

	bovino	coniglio	suino	ovino
Forme respiratorie	36	32	36	11
Setticemie	/	18	/	2
Forme riproduttive	/	11	/	/
Mastiti	/	/	/	5
altro	3	28	4	2

Tab.5 Distribuzione dei geni di virulenza per tipo capsulare (tra parentesi i valori in percentuale)

	Tipo A	Tipo B	Tipo D	Tipo F
hgbB	53 (37)	1 (50)	23 (88)	4 (17)
hgbB+pfhA	10 (7)	/	1 (4)	/
hgbB+toxA	1 (0,5)	/	/	/
pfhA	32 (22)	/	/	19 (83)
pfhA+tbpA	36 (25)	1 (50)	/	/
tbpA	2 (1,5)	/	/	/
tbpA+toxA	8 (5)	/	2 (8)	/
No fatt. vir.	3 (2)	/	/	/
totale	145	2	26	23

L'alta variabilità antigenica e l'ampio spettro d'ospite di *P. multocida*, così come le differenti patologie riscontrate rendono complesso il ricorso alla profilassi indiretta. La tipizzazione molecolare in corso di focolai di malattia fornisce uno strumento diagnostico per la valutazione del ruolo patogeno dei ceppi isolati. Inoltre, può essere impiegata nel processo di selezione degli stipiti per l'allestimento di vaccini stabulogeni.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- 1) Atashpaz S., Shayegh J., Hejazi M. S. (2009) "Rapid virulence typing of *Pasteurella multocida* by multiplex PCR" Res Vet Sci 87: 355-357
- 2) Dziva F., Muhairwa A.P., Bisgaard M., Christensen H. (2008) "Diagnostic and typing options for investigating diseases associated with *Pasteurella multocida*" Vet microbial 128: 1-22
- 3) Ewers C., Lubke-Becker A., Bethe A., Kießling S., Filter M., Wieler L.H. (2006) "Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status" Vet Microbiol 114:304-317
- 4) Harper M., Boyce J.D., Adler B. (2006) "Pasteurella multocida pathogenesis: 125 years after Pasteur" FEMS Microbiol Lett. 265: 1-10
- 5) Kirsty M., Townsend, John D. Boyce, Jing J. Chung, Alan J. Frost, Ben Adler (2001) " Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system" J Clin Microbiol 39: 924-929
- 6) Mutters R., Mannheim W., Bisgaard M. (1989) "Taxonomy of the group. In : Adlam C., Rutter J.M. (Eds). *Pasteurella* and *Pasteurellosis*. Academic Press, London, pp. 3-34"
- 7) Tang X., Zhao Z., Hu J., Wu B., Cai X., He Q., Chen H. (2009) "Isolation, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China" J Clin Microbiol 47: 951-958

SUMMARY

The aim of this study was to investigate the distribution of genes encoding virulence factors and capsular antigens of *P. multocida* isolates from different animal species affected by Pasteurellosis. For this purpose, 195 strains collected during diagnostic activity were analyzed by two modified multiplex PCR protocols. All serotypes were detected, except for serotype E; isolates belonging to serotype A were the most represented. Correlations between capsular types and specific hosts, as well as between some virulence genotypes and specific diseases, were found.

UTILIZZO DI TECNICHE MORFOLOGICHE E DI BIOLOGIA MOLECOLARE PER L' IDENTIFICAZIONE DI *ANISAKIS* SPP. IN SPECIE ITTICHE DI INTERESSE COMMERCIALE: DATI PRELIMINARI

Serracca L.¹, Prearo M.², Cencetti E.¹, Pavoletti E.², Fioravanti M. L.³, Righetti M.², Di Donfrancesco B.², Battistini R.¹, Rossini I.¹, Ercolini C.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Sezione La Spezia Laboratorio di Microbiologia Marina;

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Laboratorio di Ittiopatologia, Torino;

³ Dipartimento Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum, Ozzano Emilia (BO).

Key words: *Anisakis*, PCR-RFLP, specie ittiche di interesse commerciale

SUMMARY

The aim of present work, was to evaluate the application of an integrated identification protocol by means of morphological and PCR-RFLP methods to identify larval form of *Anisakis* spp. in fishes sampled in north Tyrrhenian and west Ligurian sea. Eighteen isolates larvae positive and difficult to identify morphologically were subjected to PCR-RFLP for the correct identification. Eight larvae were identified by PCR-RFLP as belonging to *A. pegreffii*, while no doubt larvae were confirmed. We can conclude that the morphological test should always be confirmed by molecular test to obtain a correct identification.

INTRODUZIONE

L'anisakidosi è una zoonosi di origine ittica sostenuta da stadi larvali di nematodi *Anisakidae*; l'uomo che si ciba di pesci infestati da larve di terzo stadio, si comporta da ospite accidentale, a fondo cieco e la larva può rimanere vitale nell'apparato digerente per un certo tempo.

La sempre maggiore diffusione di preparazioni culinarie etniche e la scarsa informazione in merito ai trattamenti da effettuare per prevenire l'insorgenza della zoonosi, hanno portato ad un crescente interesse sull'argomento da parte degli enti di ispezione. Il metodo attualmente in uso per l'identificazione delle larve di *Anisakis* è quello basato sull'osservazione diretta e sulla speratura delle porzioni muscolari. L'incidenza delle infestazioni sui prodotti della pesca risulta essere piuttosto elevata, ma non tutti i parassiti sono in grado di infestare l'uomo, quindi è di grande interesse riuscire ad ottenere una corretta identificazione delle larve per evitare di distruggere partite di pescato erroneamente ritenute pericolose per la salute pubblica (4). Negli ultimi vent'anni, l'applicazione dei metodi molecolari, ha permesso una più precisa diagnosi differenziale delle specie di *Anisakis* coinvolte nell'anisakiasi umana (1; 2).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'utilizzo integrato del metodo di identificazione morfologica, con quello biomolecolare, per una miglior identificazione delle larve potenzialmente zoonotiche, isolate da prodotti ittici di interesse commerciale.

MATERIALI E METODI

Nel periodo tra ottobre 2010 e luglio 2011 sono stati analizzati un totale di 257 campioni appartenenti a diverse specie ittiche (tabella 1). I campioni sono stati reperiti presso i mercati ittici di La Spezia e Piombino e pescati nell'area di mare compresa fra il nord Tirreno e il mar Ligure orientale, trasportati e conservati a temperatura di refrigerazione fino al momento dell'analisi. Gli individui analizzati, sono stati sottoposti ad esame visivo e successiva eviscerazione, per la ricerca di larve L3 di nematodi *Anisakidae*; il pacchetto intestinale è stato quindi lasciato 30

minuti sotto una fonte di calore in soluzione fisiologica, per permettere la fuoriuscita delle larve eventualmente presenti. La porzione muscolare dei vari soggetti è stata ridotta a filetti di spessore inferiore al centimetro ed osservata tramite speratura. Tutte le larve isolate sono state conservate in etanolo al 70%, e successivamente osservate allo stereomicroscopio per l'identificazione attraverso caratteri morfologici. Le larve identificate morfologicamente come appartenete al genere *Anisakis* e quelle difficilmente classificabili, sono state sottoposte ad un'ulteriore caratterizzazione molecolare mediante PCR-RFLP per verificare la presenza dei frammenti caratteristici delle varie specie di *Anisakis* presenti nel mar Mediterraneo. Le larve sono state frammentate con bisturi e sottoposte all'estrazione degli acidi nucleici attraverso l'impiego di kit basati sull'utilizzo di resine a scambio ionico (Invitrogen). Il DNA ottenuto è stato sottoposto ad un protocollo di PCR-RFLP per l'amplificazione delle regioni ITS del rDNA, a questo scopo sono stati utilizzati i primers NC5 (5'-GTAGGTGAACCTGCGAAGGATCATT-3') e NC2 (5'-TTAGTTTCTTTCTCCGCT-3'). La mix di amplificazione è stata eseguita secondo metodica presente in letteratura e i prodotti di amplificazione sono stati visualizzati tramite elettroforesi su gel di agarosio al 2%; i campioni risultati positivi, sono stati sottoposti ad analisi di restrizione mediante l'utilizzo di tre enzimi: *HhaI*, *HinfI*, *TaqI*. I prodotti di digestione sono stati visualizzati tramite elettroforesi su gel di agarosio al 2% e identificati secondo i pattern di RFLP disponibili in letteratura (1, 3, 5).

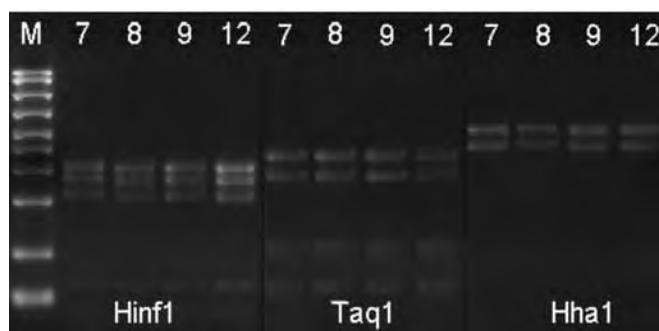


Figura 1: RFLP pattern delle regioni ITS con gli enzimi *HhaI*, *HinfI* e *TaqI*

RISULTATI

Dai 257 individui analizzati sono stati isolati dalla cavità celomatica un totale di 368 larve di nematodi appartenenti alla famiglia *Anisakidae*; di questi il 2,17% (8/368) è stato identificato morfologicamente, come appartenete al genere *Anisakis*

e il 2,7% (10/368) come dubbio, oppure non identificabile perché mancante di porzioni anatomiche indispensabili per la caratterizzazione morfologica. Nessuna larva è stata isolata dalle porzioni muscolari.

L'analisi biomolecolare ha permesso di confermare tutti i campioni morfologicamente risultati positivi (8/368) e di identificarli come appartenenti alla specie *Anisakis pegreffii*, mentre tutti campioni dubbi (10/368) sono risultati negativi (Tabella 1).

Le specie ittiche risultate infestate da larve di *Anisakis*, sono risultate essere il sugarello (*Trachurus trachurus*) e lo sgombrò (*Scomber scombrus*), pescate rispettivamente a fine ottobre e a metà di luglio.

Tabella 1: Risultati della ricerca di larve appartenenti alle genere *Anisakis* in specie ittiche mediante analisi morfologica e PCR-RFLP

Specie	N° individui	N° individui infestati	N° tot larve isolate	Larve positive Morfologico	Larve positive RFLP
<i>Mullus barbatus</i>	67	32	150	2 (dubbio)	0
<i>Pagellus erythrinus</i>	43	18	45	0	-
<i>Diplodus sargus</i>	32	0	0	0	-
<i>Boops boops</i>	26	9	21	7 (dubbio)	0
<i>Scorpaena notata</i>	25	12	20	0	-
<i>Chelidonichthys obscurus</i>	12	7	54	0	-
<i>Lithognathus mormyrus</i>	11	2	2	0	-
<i>Scomber scombrus</i>	7	4	5	5	5
<i>Serranus scriba</i>	7	7	45	0	-
<i>Merluccius merluccius</i>	4	1	1	0	-
<i>Diplodus annularis</i>	3	1	3	1 (dubbio)	-
<i>Raja asterias</i>	3	0	0	0	-
<i>Pagellus acarne</i>	3	0	0	0	-
<i>Trachurus trachurus</i>	2	2	3	3	3
<i>Trachinus draco</i>	2	1	4	0	-
<i>Conger conger</i>	2	2	3	0	-
<i>Scorpaena scrofa</i>	1	1	1	0	-
<i>Aulopus filamentosus</i>	1	0	0	0	-
<i>Arnoglossus laterna</i>	1	0	0	0	-
<i>Lophius piscatorius</i>	1	0	0	-	-
<i>Boops salpa</i>	1	1	10	0	-
<i>Helicolenus dactylopterus</i>	1	0	0	-	-
<i>Uranoscopus faber</i>	1	0	0	0	-
<i>Spondyliosoma cantharus</i>	1	1	1	0	-
	N° individui	N° individui infestati	N° tot larve isolate	Larve positive Morfologico	Larve positive RFLP
Totali	257	101	368	18	8

DISCUSSIONE

Grazie all'utilizzo del metodo biomolecolare, è stato possibile arrivare ad una corretta identificazione delle larve di nematodi isolati, anche quando questi risultavano essere di difficile attribuzione.

Spesso, infatti, con il metodo di indagine morfologica è molto difficile dare esito certo qualora le larve siano mancanti di porzioni anatomiche, oppure particolarmente difficili da chiarificare.

Inoltre, la PCR-RFLP, permette di identificare la specie, fornendo informazioni tassonomiche utili per gli studi epidemiologici, sulla diffusione di *Anisakis* nel mar Mediterraneo.

BIBLIOGRAFIA

1. D'Amelio S., Mathiopoulos K.D., Santos C.P., Pugachev O.N., Webb S.C., Picanco M., Paggi L. (2000). Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: Ascaridoidea) defined by polymerase-chain-reaction-based restriction fragment length polymorphism. *Int. J. Parasitol.*, 30: 223-226.
2. Paggi L., Mattiucci S., D'Amelio S. (2001). Allozyme and PCR-RFLP markers in anisakid nematodes, aetiological agents of human anisakidosis. *Parassitologia*, 43, suppl 1: 21-27.
3. Pontes T., D'Amelio S., Costa G., Paggi L. (2005). Molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fishes of Madeira by a PCR-based approach, with evidence for a new species. *J. Parasitol.*, 91; 1430-1434.
4. Pozio E. (2004). Zoonosi parassitarie trasmesse da prodotti ittici. *Rapporti ISTISAN* 05/24.
5. Zhu X., Gasser R.B., Podolska M., Chilton N.B. (1998). Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *Int. J. Parasitol.*, 28: 1911-1912.

IDENTIFICAZIONE DEI PRINCIPALI PATOGENI ALIMENTARI TRAMITE REAL TIME PCR

Simula G.¹, Perria F.², Savoldi Boles M.²

¹Isogem srl, ²Biodiversity spa

Keyword: Patogeni, matrici, PCR

SUMMARY

The aim of this work was to identify the main pathogens responsible for food contamination and to develop protocols in Real Time PCR for their specific identification.

INTRODUZIONE

Le problematiche relative alla sicurezza alimentare rappresentano un punto centrale nella tutela della salute pubblica.

I prodotti alimentari non devono presentare rischi igienico-sanitari per i consumatori e devono essere conformi alla normativa vigente. Microrganismi patogeni e le loro tossine devono essere assenti o presenti entro limiti tali da non causare rischi. Nei Regolamenti (CE) n° 2073/2005(1) e 1441/2007 (2) è indicato come orientarsi nello stabilire l'accettabilità di un prodotto alimentare.

In passato, la ricerca di batteri patogeni era effettuata solo nel prodotto finito, prima della commercializzazione, in questo modo però non era possibile determinare la fase fonte dell'eventuale contaminazione. Per questo di fondamentale importanza è diventato il controllo di qualità su tutte le fasi di preparazione, in modo da garantire al consumatore alti livelli di sicurezza. Per molte categorie alimentari è quindi sempre più forte l'esigenza di metodiche analitiche rapide e sensibili. Tra queste metodiche spicca la Real Time PCR che consente infatti di ottenere un risultato attendibile in poche ore, rispetto ai giorni impiegati con le metodiche microbiologiche tradizionali.

Lo scopo del lavoro è stato quello di identificare i principali patogeni responsabili delle contaminazioni alimentari e sviluppare protocolli per la loro identificazione in Real Time PCR. Sono stati studiati 6 dei patogeni che più frequentemente causano contaminazione alimentare: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* e *Yersinia enterocolitica*.

MATERIALI E METODI

Per ogni patogeno è stato effettuato uno studio bibliografico dei lavori più innovativi e interessanti pubblicati per lo sviluppo di un metodo di riconoscimento in Real Time PCR.(3,4,5).

Per ogni patogeno, dopo avere individuato le zone di DNA più adatte ad effettuare il disegno del protocollo Real Time PCR, le sequenze dei geni di interesse, sono state scaricate dal sito: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).

Con il programma Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) si è effettuata una ricerca di sequenze omologhe al gene di interesse, all'interno dei generi correlati filogeneticamente con la specie in esame e tali sequenze sono state allineate tramite ClustalW di BioEdit.

Con l'aiuto del programma Primer3: (<http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3>) sono stati disegnati gli oligonucleotidi per l'indagine molecolare. Sono quindi state fatte delle verifiche di specificità degli oligonucleotidi.

La Real Time PCR si basa sull'impiego della Taq Polimerasi,

enzima che catalizza la reazione di amplificazione in vitro di una particolare sequenza di DNA a partire da una frazione di acido nucleico che viene utilizzata come stampo. A differenza di una PCR "classica", gli amplificati non vengono rivelati tramite una elettroforesi su gel di agarosio, ma grazie ad una misura strumentale della fluorescenza emessa, quantificabile e visualizzabile graficamente.

Dopo l'amplificazione del DNA, l'amplificato è stato fatto correre su un gel di agarosio mediante elettroforesi e la banda ottenuta è stata purificata e utilizzata per preparare il DNA plasmidico mediante clonaggio e trasformazione in cellule competenti. Il DNA plasmidico prodotto per ciascun patogeno è stato poi utilizzato per l'ottimizzazione del protocollo in termini di efficienza, riproducibilità e sensibilità e per la quantificazione dei risultati.

Sono state effettuate prove di contaminazione sperimentale su diverse matrici alimentari (latte, formaggio, carni, insalata e farina).

I Ceppi batterici utilizzati sono stati:

Listeria monocytogenes, ATCC 9610; *Listeria monocytogenes*, ATCC 7644;

Salmonella *thyphimurium*; *Salmonella* *montevideo*; *Salmonella* *gatow*; *Salmonella* *Glostrup*.

Staphylococcus aureus ATCC 43300 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Clostridium perfringens NCTC 8797

Bacillus cereus NCIMB 7587

Yersinia enterocolitica ATCC 9680

Poiché nelle matrici alimentari è probabile la presenza di sostanze in grado di interferire o inibire la reazione di amplificazione del DNA, sono state valutate differenti metodiche estrattive:

DNeasy® Blood & Tissue, Qiagen

NucleoSpin® Blood Macherey-Nagel,

Blood Genomic DNA Isolation Kit Norgen

NucleoSpin® Food Macherey-Nagel

Milk Bacterial DNA Isolation Kit Norgen

RISULTATI

Tra i diversi kit commerciali utilizzati per estrarre il DNA dei batteri dalle matrici alimentari sperimentalmente contaminate, il NucleoSpin® Food Macherey-Nagel si è dimostrato il più efficiente. Utilizzando infatti la stessa matrice contaminata per l'estrazione del DNA dei diversi batteri con tutti i Kit di estrazione a disposizione, il DNA estratto con il NucleoSpin® Food Macherey-Nagel da un miglior prodotto di amplificazione.

Per l'identificazione molecolare di *Listeria monocytogenes* è stato considerato il gene *inlA*, che codifica per un fattore di virulenza specifico di questa specie. La sonda utilizzata è stata marcata con il fluoroforo Fam, che emette a 516 nm. L'amplificato ottenuto è lungo 250 pb.

Profilo termico: 95°C per 10 min (1 ciclo), 95 °C per 30 sec, 56°C per 1 min (50 cicli)

La miscela di reazione contiene una concentrazione finale di

1X Buffer, 2 mM $MgCl_2$, 0,2 mM di ciascun nucleotide, 0.04 U/ μ l Taq polimerasi, 0,4 μ M Primers e 0,36 μ M Probe in un volume finale di 50 μ l con 5 μ l di template.

Il limite di sensibilità in seguito alle analisi effettuate su DNA plasmidico è di 1,5 0E +00 copie/ μ l.

Per l'identificazione molecolare della *Salmonella* spp, è stato utilizzato come *target* di riferimento un tratto del segmento 7/20 del genoma codificante per una putativa nucleasi. La sonda è stata marcata con Texas red che emette a 620 nm.. Si è utilizzato lo stesso profilo termico utilizzato per l'amplificazione del DNA della *Listeria monocytogenes*, ottenendo un amplificato di 98 pb. La miscela di reazione contiene una concentrazione finale di 1X Buffer, 2,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM di ciascun nucleotide, 0.06 U/ μ l Taq polimerasi, 0,3 μ M Primers e 0,2 μ M Probe in un volume finale di 50 μ l con 5 μ l di template.

Il limite di sensibilità in seguito alle analisi effettuate su DNA plasmidico è di 7E +00 copie/ μ l.

Per l'identificazione molecolare dello *Staphylococcus aureus* è stato considerato il gene *nuc*, codificante per il precursore della termonucleasi. La sonda è stata marcata con il fluoroforo Fam e l'amplificato ottenuto è di 168 pb.

Profilo termico: 95°C per 10 min (1 ciclo) , 95 °C per 20 sec, 65°C per 1 min, 72°C per 30 sec (50 cicli)

La miscela di reazione contiene una concentrazione finale di 1X Buffer, 2,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM di ciascun nucleotide, 0.06 U/ μ l Taq polimerasi, 0,4 μ M Primers e Probe in un volume finale di 50 μ l con 5 μ l di template. Il limite di sensibilità in seguito alle analisi effettuate su DNA plasmidico è di 2.50E +01copie/ μ l.

Per l'identificazione di *Clostridium perfringens* è stato scelto il gene 16S rDNA. La sonda è stata marcata con il fluoroforo Fam. L'amplificato è lungo 105 pb. Profilo termico: 95°C per 10 min (1 ciclo) , 95 °C per 20 sec, 58°C per 1 min (50 cicli).

La miscela di reazione contiene una concentrazione finale di 1X Buffer, 2,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM di ciascun nucleotide, 0.04 U/ μ l Taq polimerasi, 0,3 μ M Primers e 0,2 μ M Probe in un volume finale di 50 μ l con 5 μ l di template.

Il limite di sensibilità in seguito alle analisi effettuate su DNA plasmidico è di 9E +00 copie/ μ l.

Per l'identificazione molecolare di *Bacillus cereus*, come *target* è stato utilizzato il gene *ph3I* e la sonda è stata marcata con FAM. L'amplificato è lungo 193 pb. Profilo termico: 95°C per 10 min (1 ciclo) , 95 °C per 30 sec, 58°C per 1 min, 72°C per 30 sec. (50 cicli). La miscela di reazione contiene una concentrazione finale di 1X Buffer, 2,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM di ciascun nucleotide, 0.06 U/ μ l Taq polimerasi, 0,3 μ M Primers e 0,2 μ M Probe in un volume finale di 50 μ l con 5 μ l di template.

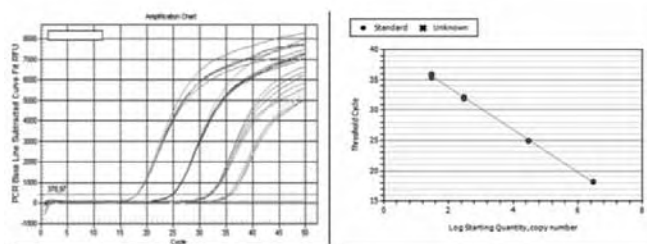
Il limite di sensibilità in seguito alle analisi effettuate su DNA plasmidico è di 2.50E +00 copie/ μ l.

Il gene scelto come *target* per l'identificazione di *Yersinia enterocolitica* è *Yst*, che codifica per un esotossina specifica per il batterio e la sonda è stata marcata con il fluoroforo Fam. L'amplificato è lungo 109 pb. Profilo termico: 95°C per 10 min (1 ciclo) , 95 °C per 20 sec, 58°C per 45 sec (50 cicli).

La miscela di reazione contiene una concentrazione finale di 1X Buffer, 3 mM $MgCl_2$, 0,2 mM di ciascun nucleotide, 0.06 U/ μ l Taq polimerasi, 0,36 μ M Primers e 0,26 μ M Probe in un volume finale di 50 μ l con 5 μ l di template.

Il limite di sensibilità in seguito alle analisi effettuate su DNA plasmidico è di 3E +00 copie/ μ l.

Prove di riproducibilità effettuate con l'utilizzo del DNA plasmidico per *Yersinia enterocolitica*:



Fluor	PCR Efficiency(%)	R Squared	Slope	y-Intercept
FAM	92,8	0,999	-3,507	40,807

DISCUSSIONE

In tutti gli esperimenti effettuati si è scelto di utilizzare un plasmide di origine esogena come controllo dell'estrazione del DNA da matrice. Il controllo scelto consiste in un plasmide contenente il gene che codifica per la luciferasi. Il controllo è stato aggiunto in ogni matrice contaminata, prima dell'estrazione. In questo modo l'eventuale presenza di sostanze inibitorie nella matrice o nella miscela di reazione di PCR può essere verificata grazie alla presenza/assenza dell'amplificato ottenuto dal plasmide di controllo.

La sonda del controllo è stata marcata con il fluoroforo HEX che emette a 556 nm, in modo da non interferire con marcature delle sonde per la rilevazione dei patogeni. Questo ha permesso la messa a punto di protocolli in multiplex.

La sonda per l'identificazione della *Salmonella* è stata marcata con il fluoroforo Texas Red e non Fam per poter lavorare con un protocollo in multiplex per l'identificazione simultanea di *Salmonella* spp, di *Listeria monocytogenes* e del controllo di estrazione. Questo poichè *Salmonella* e *Listeria* contaminano spesso le stesse matrici.

Sono state inoltre create diluizioni del DNA genomico dei diversi batteri con le quali è stato possibile testare ulteriormente i limiti di sensibilità dei protocolli utilizzati.

Dai risultati emerge che in seguito alle analisi effettuate con i DNA plasmidici e genomici, per ciascun patogeno si ottiene un'elevata sensibilità e riproducibilità.

BIBLIOGRAFIA

1. Regolamento (CE) N.2073/2005 della commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.
2. Regolamento (CE) N.1441/2007 della commissione del 5 dicembre 2007 che modifica il regolamento (CE) n. 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.
3. Navas J., Ortiz S., Lopez P., Jantzen M., Lopez V., Martine-Suarez J.V. (2006). Evaluation of effect of primary and secondary enrichment for the detection of *Listeria monocytogenes* by Real time PCR in retail ground chicken meat. Foodborne pathogens and disease volume 3.
4. Mark G., Siragusa G. Quantitative detection of *Clostridium perfringens* in the broiler fowl gastrointestinal tract by Real Time PCR. (2005). Applied and Environmental microbiology, p.3911-3916.
5. Vishnubhatla A., Fung D.Y., Oberst R.D., Hays M.P., Nagaraja T.G., Flood S.J.A. (2000). Rapid 5'nuclease (TaqMan) assay for detection of virulent strains of *Yersinia enterocolitica*. Applied and environmental microbiology, p. 4131-4135.

VALUTAZIONE DEI CAMPIONI POSITIVI PER CORTISONICI SU MATRICE URINA NELLA REGIONE PIEMONTE

****Sperone V., *Capra P., *Ciccotelli V., *Brizio P., *** Leporati M., **Rosso C.,** Meinero P.,
Pistone G.C., *Abete M. C., *Gili M.

**Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino*

***Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Sezione di Cuneo, Via S. Pertini, 11 – 12100 Cuneo*

**** Centro regionale antidoping "A. Bertinaria", Reg. Gondole, 10/1 – 10043 Orbassano (TO)*

Key words: Cortisonici, Urine bovine ed equine.

INTRODUZIONE

Nell'ambito del Piano Nazionale Residui (PNR) sono previsti anche campionamenti riguardanti la categoria residui A3, per la ricerca del gruppo cortisonici, su matrici urine e fegato appartenenti alle categorie animali bovini ed equini.

Si è deciso di utilizzare i dati ottenuti dalle analisi, sulla sola matrice urina, del biennio 2009-2010 e dei primi otto mesi dell'anno 2011 per valutare quali siano gli andamenti delle positività in ambito della Regione Piemonte e soprattutto stimare la percentuale di risultati falsamente positivi.

La presenza di queste molecole, è regolamentata da specifiche direttive che fissano i limiti massimi consentiti, riportati nella tabella 1

Tabella 1 – Limiti di legge nelle urine (CCβ screening)

CORTISONICI	µg/L
Vitelli	2.0
Vitelloni	2.0
Vacche	2.0
Equini	2.0

MATERIALI E METODI

La ricerca è stata effettuata su un totale di 1677 campioni di urine prelevati dalla varie AA.SS.LL. dei distretti della Regione Piemonte.

Per la fase di screening viene utilizzata una metodica ELISA di tipo competitivo su micropiastra in polistirene adsorbita con anticorpi (IgG) di capra anti anticorpi (IgG) di coniglio.

Ogni campione viene centrifugato a 4000 rpm per 10', il surnatante viene diluito 1:25 con tampone di diluizione e questa diluizione viene utilizzata per il saggio. Vengono inseriti nella prova anche un' urina di controllo, sicuramente negativa, e la stessa positivizzata con Betametasone alla concentrazione di $0.1 \div 0.12$ ng/µL. Tutti i campioni e tutti i controlli, compreso quello per il segnale massimo (Bo), vengono caricati in duplicato. L'assorbanza dell'avvenuta reazione viene letta con uno spettrofotometro per piastre con $\lambda = 450$ nm. Il calcolo dei risultati è effettuato dividendo il valore medio di assorbanza di ogni campione e di ogni controllo per il valore medio di assorbanza del segnale massimo (Bo) e moltiplicando per 100 il risultato ottenuto.

La tecnica di conferma utilizza invece una metodica LC-MS/MS con analizzatore a triplo quadrupolo e ionizzazione APCI in modalità positiva. Per ciascun analita vengono acquisite tre transizioni precursori a prodotto, corrispondenti a 4,5 punti di identificazione come definiti dalla Decisione 2002/657/CE.

Ciascun campione è processato in doppio; la preparazione del campione comprende deconiugazione enzimatica ed estrazione liquido/liquido con dietiletere.

Nella tabella 2 sono riportati i CCα e CCβ ottenuti in validazione per il metodo di conferma.

Tabella 2 – CCα e CCβ ottenuti in validazione per il metodo di conferma.

PARAMETRO	BTM	DSM	FLU	PRE	PRL	6α
CCα (µg/L)	0,61	0,59	0,63	0,66	1,21	1,20
CCβ (µg/L)	0,69	0,65	0,73	0,79	1,38	1,34

BTM: betametasone; **DSM:** desametasone; **FLU:** flumetasone, **PRE:** prednisone; **PRL:** prednisolone; **6α:** 6α-metilprednisolone.

RISULTATI

Nella tabella 3 vengono indicati i risultati ottenuti durante il biennio 2009-2010 ed i primi otto mesi del 2011.

Dei 690 campioni eseguiti nel primo anno considerato 651 sono risultati negativi alle analisi di screening e 39 positivi, di questi ultimi ne sono stati confermati 14.

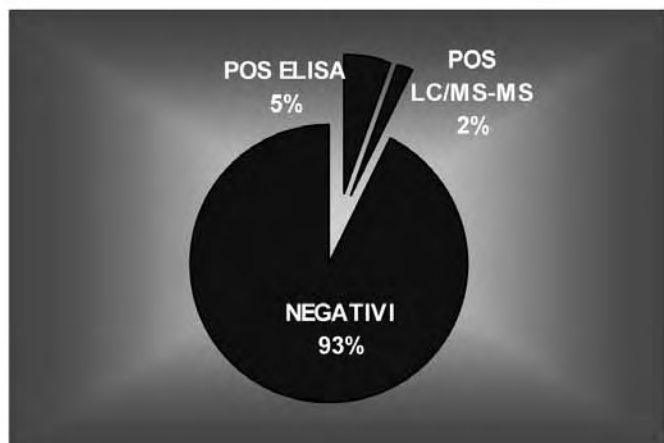
Tabella 3 – Risultati ottenuti biennio 2009 -2010 e primi otto mesi del 2011.

	CAMPIONI ESEGUITI	CAMPIONI POSITIVI SCREENING ELISA	CAMPIONI POSITIVI CONFERMA LC/MS-MS	CAMPIONI NEGATIVI
2009	690	39	14	651
2010	535	41	11	494
2011	452	12	4	440

Per l'anno 2010 su un totale di 535 campioni 41 hanno dato esito positivo allo screening e 11 di questi sono stati confermati. Per l'anno in corso su 452 urine analizzate 13 hanno risposto positivamente al test di screening e 5, al momento, sono state confermate con la metodica strumentale.

Si osserva che la percentuale di false positività oscilla tra il 7-8% del biennio ed è del 3% sui primi due quadrimestri 2011. Mentre i veri positivi sono costanti su di un valore del 2% per il biennio e dell'1% per i primi due quadrimestri.

Grafico 1 – Percentuali di tutto il periodo considerato.



Per l'anno 2009 tutti i campioni positivi con la tecnica LC-MS/MS sono stati confermati dall'I.S.S. durante le procedure di Revisione di Analisi. Per gli anni successivi queste sono ancora in corso.

CONCLUSIONI

Analizzando i risultati ottenuti si può osservare che i veri positivi, sul totale dei campioni analizzati per tutto il periodo considerato, corrispondono ad un 2% e che con la metodica ELISA si ha quindi una percentuale di risultati falsamente positivi di circa il 4%. La metodica di screening è stata messa

a punto in modo da fornire il minor numero possibile di risultati falsamente negativi. Il compito di questo tipo di indagine a tappeto è infatti quello di dare un'idea della diffusione del fenomeno legato all'uso fraudolento degli anabolizzanti.

Si conferma pertanto la validità dell'utilizzo delle metodiche di screening al fine del monitoraggio dei promotori di crescita; inoltre valutate le performance analitiche ed i costi di esecuzione della tecnica ELISA questa, al momento, rimane la più conveniente.

SUMMARY

For the screening phase is used, competitive ELISA on polystyrene microtiter plate coated with antibodies (IgG) anti-goat antibodies (IgG) rabbit. The absorbance of the future reaction is read with a spectrophotometer at 450 nm plates.

The technique uses instead a method of confirmation by LC-MS/MS analyzer quadrupole and triple ionization in APCI positive mode. The sample preparation includes enzymatic deconjugation and liquid/liquid extraction with diethylether.

4% of the sample analyzed during the screening was non-compliant while 2% was confirmed in LC-MS/MS.

BIBLIOGRAFIA

1. D.L. 158 del 16/03/2006
2. Direttiva 96/22/CE
3. Direttiva 96/23/CE
4. Decisione CEE 657/2002 del 12/08/2002
5. Regolamento UE 37/201

RICERCA DIRETTA DI PARASSITI GASTROINTESTINALI: DUE METODI A CONFRONTO

Torina A., Galuppo L., Martorana C., Migliazzo A., Pisano P., Licitra F., Francaviglia F.¹ & Caracappa S.Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri", Palermo, Italy
1 Dipartimento di Prevenzione Veterinaria -Azienda Sanitaria Provinciale 6 Palermo, Italy**Key words:** parassiti intestinali, flottazione**SUMMARY**

The present study was carried out to investigate on the presence of gastrointestinal parasites of dogs living in a public kennel in the city of Palermo. In this study were compared a commercial kit with the traditional flotation method, routinely used in our laboratory. The kit is faster and easier to use but it revealed a slightly difference in sensitivity as it did not allow to reveal the presence of *Eimeria spp.* in several faeces samples.

INTRODUZIONE

Tra le parassitosi degli animali da compagnia, quelle sostenute dai parassiti gastrointestinali rappresentano la percentuale più rappresentata. I parassiti vivendo a spese dell'organismo che li ospita, lo debilitano e lo indeboliscono al punto che l'animale deve essere sottoposto a visita veterinaria e specie nel caso di infestazioni massive possono essere causa anche di morte (1,2,3) dell'ospite. Si tratta ancora di infestazioni da non sottovalutare per le ripercussioni in campo animale ma anche per il carattere zoonotico delle patologie sostenute da alcuni di essi (5). La gravità della sintomatologia è direttamente proporzionale al livello di infestazione presente. Le percentuali più alte di positività si hanno per lo più in animali che coabitano (allevamenti, canili, negozi, pensioni per animali...). Molto più spesso le infestazioni sono multiple sostenute da diverse specie di parassiti.

MATERIALI E METODI

Sono stati prelevati ottanta campioni di feci presso il canile municipale di Palermo da cani giovani con età compresa tra i 1 e i 3 anni. Lo scopo del lavoro è stato quello della comparazione di due metodiche di flottazione: il metodo classico ed uno che prevede l'utilizzo di un kit commerciale. I campioni sono stati saggiati utilizzando: il metodo classico di flottazione con soluzione satura di peso specifico 1340 ed il kit disponibile in commercio identificato come Centrifugal flotation method (ParasiTrap Flotation PLUS small animals – Biosepar®)

Per la Flottazione classica:

4-5 gr di feci sono stati omogenati con acqua di fonte e 10 ml di filtrato è stato raccolto in una provetta e centrifugato per 5 minuti ad una velocità 1500-2000 giri al minuto. Dopo ripetuti lavaggi, è stata aggiunta al sedimento la soluzione densa di nitrato di sodio e glucosio (1340) sino a formare un menisco convesso alla sommità della provetta sul quale è stato adagiato un vetrino copri-oggetto per 10 minuti. Al termine dei 10 minuti il vetrino copri-oggetto è stato posto su un portaoggetto ed è stato osservato al microscopio a piccolo ingrandimento (10X e 40X).

Centrifugal flotation method (ParasiTrap Flotation PLUS small animals – Biosepar®)

La quantità di feci utilizzata per la diagnosi è stabilita dal misurino contenuto nel processing tube I (pari a circa 0,5 g). Il campione in esame è stato omogenato con i 5,5 ml di flotation plus solution density 1320 e filtrato per mezzo del processing tube II e successivamente centrifugato per 5 minuti a 250-300 g.

Dopo la rimozione del filtro separatore, alla provetta contenente la sospensione è stata aggiunta la soluzione ParasiTrap Flotation PLUS Medium fino alla formazione di un menisco convesso alla sommità della provetta sul quale

è stato adagiato un vetrino coprioggetto per 30 minuti. Al termine dei 30 minuti il vetrino coprioggetto è stato posto su un portaoggetto ed osservato al microscopio a piccolo ingrandimento (10X e 40X). L'identificazione dei parassiti è stata effettuata utilizzando le chiavi di lettura disponibili in bibliografia (4, 6).

RISULTATI

Così come evidenziato nella tabella 1, cinquanta campioni sono risultati negativi a entrambi i metodi, due rivelati negativi tramite il Kit ParasiTrap ma positivi tramite la metodica di Flottazione classica e ventotto campioni rivelati positivi da entrambe le metodiche.

		Flottazione classica		
		Positivi	Negativi	
Kit ParasiTrap	Positivi	28	0	28
	Negativi	2	50	52
	Totale	30	50	80

Tab. 1

La presenza dei parassiti nei cani positivi era così distribuita:

Parassiti presenti	Flottazione classica	ParasiTrap Flotation PLUS small animals – Biosepar®)
<i>Toxocara canis</i>	10	10
<i>Eimeria spp</i>	12	10
<i>Ancylostoma</i>	16	16
<i>Trichuris</i>	10	10

Tab. 2

In 14 cani è stato possibile evidenziare infestazioni multiple e questo con entrambe le metodiche utilizzate. In otto casi sono stati ritrovati contemporaneamente *Trichuris spp.* e *Ancylostoma spp.* In quattro casi *Trichuris spp.*, *Eimeria spp.* e *Ancylostoma spp.* In due casi *Toxocara spp.* ed *Ancylostoma spp.*

In due soli soggetti la parassitosi da *Eimeria spp.* è stata svelata unicamente con la flottazione classica e non con la metodica prevista dal kit commerciale.

DISCUSSIONE

Con l'utilizzo del kit il numero di oocisti era inferiore a quello svelato con la flottazione classica mentre i restanti due erano negativi.

Il kit fornito da Biosepar ha come vantaggi una maggiore rapidità di esecuzione per il fatto che i reagenti sono già pronti per l'uso ed aliquotati in contenitori monouso, è richiesta una sola centrifugazione e si può lavorare con una esigua quantità di materiale fecale. Inoltre la soluzione densa utilizzata per la flottazione fornita dal kit permette una buona osservazione dei preparati microscopici per tempi maggiori, caratteristica utile quando si è di fronte ad un numero consistente di campioni. La metodica classica della flottazione prevede un elevato numero di lavaggi, richiede un maggiore quantità di materiale di partenza ed è più "time-consuming" a causa dei numerosi round di centrifugazione e lavaggio.

Dai dati emersi, si evince che con il metodo della Flottazione Classica gli individui positivi ad infestazione parassitaria erano 30 su 80 (37,5%), mentre con il kit commerciale ParasiTrap Flotation 28 su 80 (35%).

Il 62,5 % dei campioni era negativo alla flottazione classica (50 campioni su 80) ed il 65 % negativo (52 campioni su 80) al kit commerciale ParasiTrap Flotation.

Del kit commerciale si è provveduto alla valutazione dei parametri sensibilità, specificità ed accuratezza.

L'accuratezza del kit commerciale testato, valutandone

quindi l'indice di concordanza K con la Flottazione Classica, è del $97,5\% \pm 5,59$ (intervallo di confidenza 95%) (6,7).

La sensibilità del kit ParasiTrap Flotation è del $93\% \pm 8,93$ (intervallo di confidenza 95%) mentre la specificità del 100% (6,7).

Pertanto, dai dati sopra analizzati, si ritiene che la metodica commerciale pur essendo un valido aiuto in termini di praticità e velocità nell'esecuzione della prova, abbia dei limiti in termini di Sensibilità rispetto alla metodica Classica, analizzando i dati più in dettaglio ciò si rileva qualora siano oggetto della diagnosi parassiti come *Eimeria spp.* o il soggetto in esame presenti cariche infestanti minime.

BIBLIOGRAFIA

1. Blagburn, B.L., Lindsay, D.S., Vaughan, J.L., Rippey, N.S., Wright, J.C., Lynn, R.C., Kelch, W.J., Ritchie, G.C., Hepler, D.I., 1996. Prevalence of canine parasites based on fecal flotation. Comp. Contin. Educ. Vet. Pract. 18, 483-509.
2. Martinez-Moreno, F.J., Hernandez, S., Lopez-Cobos, E., Becerra, C., Acosta, I., Martinez-Moreno, A., 2007. Estimation of canine intestinal parasites in Córdoba (Spain) and their risk to public health. Vet. Parasitol. 143, 7-13.
3. Sloss M.W., Kemp R.L Parassiti in medicina veterinaria ed-ermes Milano 1985.
4. Traub, R.J., Robertson, I.D., Irwin, P., Mencke, N., Andrew Thompson, R.C., 2002. The role of dogs in transmission of gastrointestinal parasites in a remote tea-growing community in northeastern India. Am. J. Trop. Med. Hyg. 67 (5), 539-545).
5. Zajak A.M., Conboy G. A. Veterinary Clinical Parasitology Blackwell Publishing Oxford 2006.
6. Wayne W. Daniel - Biostatistica (1996; EdiSES).
7. Peter Armitage & Geoffrey Berry- Statistica Medica- (1996 McGraw-Hill).

DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DELL'ALBUMINA NEL LATTE IN BOVINE DI RAZZA PEZZATA ROSSA

Trimboli F.¹, Siclari E.¹, Procopio A.¹, Poerio A.², Britti D.¹

¹Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica dell'Università degli Studi "S. Venuta" di Catanzaro²; Libero professionista.

Key words: Albumina, Pezzata Rossa.

ABSTRACT

Mastitis, an important disease of dairy cow, influences quantity and composition of milk. Degree of these changes depends on the infecting agent and the inflammatory response. Increases in milk concentration of albumin occur during mastitis suggesting its use as a diagnostic tool of disease. As the normal value of albumin concentration in milk vary according to breed, to season, and lactation period, it is important to have albumin reference values in relation to these variables. In our work, we determined albumin concentration in Pezzata Rossa Austriaca breed, in summer and early lactation period.

INTRODUZIONE

La mastite ha un impatto economico rilevante a carico del comparto produttivo della vacca da latte (6). L'infiammazione della ghiandola mammaria altera la composizione del latte influenzandone sia la quantità che la qualità con ricadute negative anche per le produzioni lattiero-casearie (1). Un aumento della componente cellulare del latte, individuata attraverso la conta della cellule somatiche (SCC), è comunemente ritenuto il principale indicatore di mastite (6). Differenti studi hanno riportato che nel latte, in corso di mastite, si osserva anche un aumento di due proteine di origine plasmatica, la serotransferrina e l'albumina (3, 2). In particolare, la concentrazione dell'albumina ha una buona correlazione con la SCC, candidando questa proteina a possibile nuovo marker di mastite (4). Gli Autori hanno determinato, inoltre, che la concentrazione media di albumina nel latte di animali sani, varia sia in relazione alla razza che alla stagione. Ad esempio, nelle vacche di razza Polish Holstein-Friesian, la concentrazione media di albumina varia tra 0,043 e 0,049 g/dL in estate, e tra 0,050 e 0,054 g/dL in inverno; mentre nelle vacche di razza Simmental, la concentrazione media dell'albumina varia tra 0,036 e 0,040 g/dL e tra 0,041 e 0,043 g/dL rispettivamente in estate e in inverno (4). Anche lo stadio della lattazione, piuttosto che il numero, può influenzare la concentrazione media di albumina nelle vacche di razza Holstein-Friesian con valori di 0,017g/dL (inizio lattazione) a 0,022 g/dL (fine lattazione) (5). Ne risulta pertanto che, per poter utilizzare l'albumina come marker di mastite, è necessario avere i valori di riferimento della proteina nel latte che tengano conto delle sue variazioni fisiologiche legate a razza, stagione e stadio di lattazione. Lo scopo del nostro lavoro è determinare gli intervalli fisiologici della concentrazione di albumina nel latte di vacche di razza Pezzata Rossa Austriaca.

MATERIALI E METODI

Raccolta latte e preparazione siero di latte

I campioni di latte sono stati raccolti individualmente da 30 vacche da latte, primipare, di razza Pezzata Rossa Austriaca, tra il primo ed il secondo mese di lattazione e clinicamente sane. Il siero di latte è stato preparato come descritto da Boehmer et al (2) apportando alcune modifiche. Brevemente, il latte è stato

prelevato, per tutti i soggetti, dal quarto posteriore sinistro. Successivamente, circa 50mL latte sono stati centrifugati a 3000g a 4°C per 30 minuti, il grasso eliminato con una spatola e parte del restante sovranatante trasferito in provette da 1,5 mL e nuovamente centrifugato a circa 18000g a 4°C per 60 minuti. Il sovranatante così chiarificato è stato conservato a -20°C fino al momento dell'uso.

Determinazione delle proteine del siero ed SDS – PAGE

Le proteine totali del siero sono state quantificate mediante saggio Bradford (Bio-Rad, Protein assay) e successivamente da 1 a 3ml caricati su gel SDS – PAGE 10% con diverse quantità di BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma – Aldrich). Dopo la corsa elettroforetica (120 V per circa 80 minuti), il gel è stato colorato con Coomassie Brilliant Blue (Coomassie Brilliant Blue G250; Sigma–Aldrich) e sottoposto ad analisi densitometrica mediante ChemiDoc™ XRS Imaging System utilizzando il programma di acquisizione e quantificazione QuantityOne (Bio – Rad).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Dalla lettura densitometrica (vedi figura 1), si ricava che la concentrazione media di albumina nel siero di latte di vacca Pezzata Rossa Austriaca al primo stadio di lattazione nella stagione estiva, è di 0,027 g/dL con una deviazione standard di 0,009 g/dL

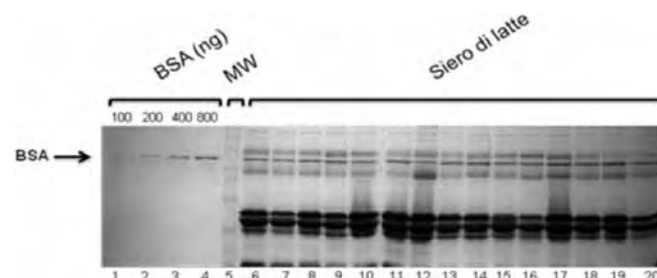


Figura 1. Corsa rappresentativa dei campioni di siero su gel SDS-PAGE colorato con Coomassie Brilliant Blue. Treml di ciascun campione di siero sono stati caricati su gel assieme a quantità crescenti di BSA altamente purificata (Sigma). Lanes 1 – 4: 100 – 200 – 400 – 800 ng di BSA purificata; lane 5: Marker di peso molecolare; lanes 6 – 20: campioni di siero.

La scelta di questa metodica è stata dettata dalla bassa concentrazione dell'albumina nel latte di vacche sane. Precedenti dati di letteratura (4, 5) riportano, infatti, concentrazioni di albumina nel latte inferiori a 0,2 g/dL. Poiché la concentrazione è al di sotto del limite di sensibilità del metodo di dosaggio colorimetrico normalmente utilizzato per dosare l'albumina nel sangue, è stato necessario scegliere un metodo di dosaggio più sensibile e nello stesso tempo facilmente controllabile. La scelta è caduta sulla colorazione delle proteine, separate su SDS-PAGE, mediante Blue Coomassie e successiva densitometria, per due motivi:

sensibilità elevata e visualizzazione diretta delle proteine di interesse tramite confronto con uno standard (BSA purificata). La concentrazione di albumina da noi ottenuta nel siero di latte (0.027 ± 0.009 g/dL) per la Pezzata Rossa Austriaca è differente da quanto riportato da altri Autori (4, 5). Questo è probabilmente legato alla diversità delle razze prese in esame confermando quanto già dimostrato da Litwinczuk. Z. et al. sulla influenza della razza nella concentrazione dell'albumina. Inoltre, nella Pezzata Rossa Austriaca, la concentrazione media di albumina, nel periodo iniziale di lattazione, è risultata superiore a quanto riportato da Poutrel et al. per la Holstein-Friesian nel periodo estivo confermando che, anche per la variabile stagionale vi è un'influenza della razza sui valori registrati. Poiché l'albumina varia in corso di mastite, questo analita è stato proposto quale marker di mastite stante la sua correlazione con la SCC (4). Ma, se è ipotizzabile l'utilità di kit rapido per la determinazione in stalla dell'albumina nel latte a supporto della diagnosi precoce di mastite, riducendo al minimo i tempi di intervento del veterinario e riducendo al minimo i costi di questa patologia per l'allevatore; questo non può prescindere dai valori di riferimento di questa proteina in base alla razza, alla stagione e allo stadio di lattazione (inizio, metà e termine). Il gruppo sta già procedendo alla determinazione dell'albumina nel latte durante gli altri stadi di lattazione per la Pezzata Rossa Austriaca e su altre razze di bovine da latte.

BIBLIOGRAFIA

1. Auldish MJ, Coats SJ, Sutherland BJ, Hardham JF, McDowell GH, Rogers GL (1996): Effect of somatic cell count and stage of lactation on the quality and storage life of ultra high temperature milk. *J Dairy Res.* Aug; 63 (3): 377-86.
2. Boehmer JL, Ward JL, Peters RR, Shefcheck KJ, McFarland MA, Bannerman DD. (2009): Proteomic analysis of the temporal expression of bovine milk proteins during coliform mastitis and label-free relative quantification. *Dairy Sci.* Feb; 93 (2): 593-603.
3. Hogarth CJ, Fitzpatrick JL, Nolan AM, Young FJ, Pitt A, Eckersall PD. (2004): Differential protein composition of bovine whey: a comparison of whey from healthy animals and from those with clinical mastitis. *Proteomics.* Jul; 4 (7): 2094-100.
4. Litwińczuk Z, Król J, Brodziak A, Barłowska J. (2010): Changes of protein content and its fractions in bovine milk from different breeds subject to somatic cell count. *J Dairy Sci.* Feb; 94 (2): 684-91.
5. Poutrel B, Caffin JP, Rainard P. (1983): Physiological and pathological factors influencing bovine serum albumin content of milk. *J Dairy Sci.* 1983 Mar; 66 (3): 535-41.
6. Viguier C, Arora S, Gilmartin N, Welbeck K, O'Kennedy R. (2009): Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends Biotechnol.* 2009 Aug; 27 (8):486-9.

VALUTAZIONE DELLE PERFORMANCE DIAGNOSTICHE DI UN SISTEMA MICROARRAY PER L'IDENTIFICAZIONE DELLE SPECIE ZOOLOGICHE IN ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE

Varcasia B. M., De Santis P., Bilei S.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

Keywords: microarray, PCR, frode alimentare

SUMMARY

The global market in foods includes also the sale of fraudulent substitutes. Exposing such illegal practises is of importance from both the commercial and sanitary points of view. In this study we evaluate a commercially available microarray system and compare it to five independently developed PCR methods. Its excellent levels of sensitivity (100%) and specificity (95.8% porcine, 96.2% bovine, 100% caprine, 97.5% ovine and 96.6% poultry), along with its ease of use and competitive price, mean the commercial kit is well suited to the rapid identification of these foods and their differentiation from substitutes that may be sold fraudulently.

INTRODUZIONE

L'identificazione di specie zoologica in alimenti d'origine animale, carni e lattiero-caseari, destinati all'uomo è finalizzata al controllo delle frodi alimentari definite "modifiche apportate intenzionalmente su prodotti alimentari per ricavarne illecito guadagno". Le frodi alimentari implicano conseguenze sia sanitarie, per danno alla salute di individui "sensibili" mediante l'induzione di reazioni avverse di tipo allergico o per intolleranza, che commerciali creando un danno economico. Fondamentale per la lotta alle frodi alimentari è la verifica di conformità di quanto dichiarato in etichetta mediante accurati metodi analitici di laboratorio in grado di evidenziare quantità, anche minime di materie prime. Dei vari metodi analitici disponibili, i metodi biomolecolari (2, 3) sono particolarmente utili per le loro caratteristiche di sensibilità e specificità e, per la stabilità della molecola bersaglio, il DNA, ai numerosi trattamenti che avvengono durante la trasformazione degli alimenti.

La tecnologia dei microarray (4, 5), già utilizzata per l'identificazione di acidi nucleici e proteine in diagnostica molecolare, è anche utile per l'identificazione di genotipi e specie sia batteriche che zoologiche. La reperibilità di sistemi microarray disponibili in commercio ha reso questa tecnologia più accessibile ai laboratori che operano nel settore della diagnostica molecolare. Nel presente studio sono state valutate le performance diagnostiche del kit GeneTop Meat™ (LifeLineLab, Italia) basato sul sistema microarray, in confronto con alcuni metodi PCR end-point (PCR) "in house" (1) per la rilevazione di cinque specie zoologiche (avicolo, bovino, caprino, ovino e suino). I metodi PCR per la specie caprina e ovina sono stati forniti dall'IZS Lombardia ed Emilia Romagna, per la specie suina dall'IZS Piemonte Liguria e Valle d'Aosta, per bovino e avicolo dall'IZS Umbria e Marche.

MATERIALI E METODI

Materiali di riferimento: sono costituiti da carne derivante dalle singole specie zoologiche d'interesse (avicolo, bovino, caprino, ovino e suino) e sono definiti "campioni puri".

Campioni: sono stati esaminati n°79 alimenti, reperiti in commercio, che includono alimenti per l'uomo, sia freschi che trasformati, mangimi per animali e baby food. I campioni, in base a quanto dichiarato in etichetta, sono così ripartiti: suino n°18,

bovino n°15, caprino n°1, ovino n°4, pollo n°12, carni miste n°17 e altre specie n°12.

Estrazione del DNA da materiali di riferimento e campioni: il DNA è stato estratto da tutti i campioni utilizzando un sistema automatizzato MagCore® Genomic DNA Tissue Kit (Resnova, Italia), quantificato mediante spettrofotometro SmartSpec Plus (BIO-RAD, Italia) e standardizzato alla concentrazione di 20 ng/μl. Ogni DNA è stato suddiviso in due aliquote: una per l'esecuzione dei metodi PCR e una per l'analisi in microarray.

PCR "in-house": i singoli metodi PCR utilizzati, amplificano sequenze specie-specifiche del DNA mitocondriale di bovino, ovino, caprino, suino e avicolo. Tutti i metodi PCR sono stati eseguiti utilizzando una master mix contenente: Reaction Buffer 1x, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 200 μM ciascuno, "hot start" Taq Gold polimerase 2,5 U (Applera, Italia), primers specifici 50 pM a reazione (Primm, Italia) (Tabella 1) e acqua per PCR DNase-RNase free (Gibco, Italia). L'amplificazione è stata condotta utilizzando un termociclatore GeneAmp 9700 (Applera, Italia), usando un volume di reazione di 50 μl. A seconda del metodo, sono state utilizzate varie temperature di annealing comprese tra 58°C e 60°C. L'amplificazione è stata evidenziata con elettroforesi su gel d'agarosio al 2,5%.

Tabella 1: Primers utilizzati. *IZSUM, **IZSLER, *IZSPLV**

Specie	Primers	Sequenza	bp
Bovino*	FW	5'-ctagacacgtcaacatgactga-3'	112
	RV	5'-gggtgtcagttctggattgtga-3'	
Suino***	FW	5'-ggatccggcattgccgttag-3'	171
	RV	5'-gtcttttttggcatttcttg-3'	
Ovino**	FW	5'-ccaaaatctccactctcca-3'	104
	RV	5'-ctctatagcgcgtgtttaga-3'	
Caprino**	FW	5'-ccatgacctccactatatttt-3'	113
	RV	5'-gggtgatgaggactagggttg-3'	
Avicolo*	FW	5'-acccctaaagacacccacc-3'	131
	RV	5'-agtgtgggggtataagttga-3'	

Microarray: il protocollo microarray è stato effettuato seguendo le istruzioni del kit GeneTop Meat™, che prevede: (1) PCR del DNA estratto-1,5h (2) denaturazione del prodotto PCR a 95°C-3min. (3) ibridazione a 50°C-40min. (4) lavaggi-5min. (5) reazione con streptavidina-fosfatasi alcalina a 50°C-20min. (6) colorazione con cromogeno-10min. (7) lettura e interpretazione dei risultati per confronto diretto tra gli "spot" accesi e lo schema fornito con il kit.

Preparazione dei materiali di riferimento: per ogni specie d'interesse è stato preparato un pannello di controlli dai materiali di riferimento (C1-C5) a varie concentrazioni di DNA, da 3,13 ng/reazione a 50 ng/reazione (Tabella 2) per poter valutare la riproducibilità ed il limite di rilevabilità (LOD) del metodo microarray.

Parametri di valutazione considerati: per la valutazione delle performance del metodo microarray sono state calcolate sensibilità, specificità, ripetibilità, concordanza e LOD. La specificità è stata determinata mediante l'utilizzo di "campioni puri" derivanti da specie zoologiche non evidenziate con il metodo microarray (cavallo, coniglio, bufalo, renna, cervo, capriolo, cinghiale e pesce). La ripetibilità è stata effettuata mediante l'esecuzione di tre saggi microarray consecutivi, utilizzando in singola replica, i campioni di controllo (C1-C5). In base ai risultati ottenuti sia dall'analisi microarray che in PCR, i campioni sono stati classificati come: (1) Concordanti (2) Parzialmente Concordanti (3) Discordanti (Figura 1).

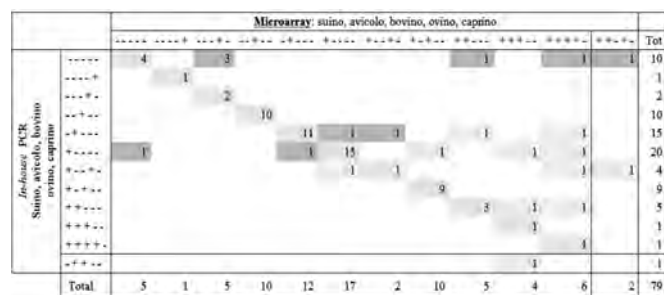
Tabella 2: Controlli di reazione

Controlli	Valori di DNA da “campioni puri” (ng/reazione)				
	Suino	Bovino	Caprino	Ovino	Avicolo
C1	50,00	3,13	6,25	12,50	25,00
C2	25,00	50,00	3,13	6,25	12,50
C3	12,50	25,00	50,00	3,13	6,25
C4	6,25	12,50	25,00	50,00	3,13
C5	3,13	6,25	12,50	25,00	50,00

Risultati

Dei 79 campioni esaminati 58 sono risultati concordanti, 11 parzialmente concordanti e 10 discordanti. I maggiori problemi di concordanza riguardano i campioni complessi come mangimi per animali e campioni altamente processati quali i baby food. Tali campioni sono stati esclusi dalle analisi successive, effettuate quindi su 42 campioni dei quali 3 sono risultati parzialmente concordanti per una percentuale del 7%.

Figura 1: Analisi della concordanza tra i due metodi saggiati



In Tabella 3 sono riportati i valori ottenuti per i parametri di valutazione delle performance del metodo microarray GeneTop Meat™. La ripetibilità per tutte le specie è risultata essere del 100%. La sensibilità è anch'essa del 100%, mentre la specificità è del 100% per la sola specie caprina per le altre specie varia dal 95,8% al 97,5% (suino 95,8%, bovino 96,2%, ovino 97,5%, avicolo 96,6%). La concordanza ha valori del 97,6% per tutte le specie considerate, ad eccezione della specie caprina con valore del 100%. Per quanto concerne il LOD, il metodo è in grado di rilevare la minimi quantità di DNA utilizzato per la preparazione dei campioni cioè 3,13 ng/reazione.

Tabella 3: Parametri di valutazione del metodo microarray
GeneTop Meat™ in alimenti

Specie	Sensibilità	Specificità	Concordanza	LOD	Ripetibilità (calcolata sui controlli C1-C5)
Suino	100.0%	95.6%	97.6%	≥ 3.13 ng	100%
Bovino	100.0%	96.2%	97.6%	≥ 3.13 ng	100%
Caprino	100.0%	100.0%	100.0%	≥ 3.13 ng	100%
Ovino	100.0%	97.5%	97.6%	≥ 3.13 ng	100%
Avicolo	100.0%	96.6%	97.6%	≥ 3.13 ng	100%

CONCLUSIONI

L'utilizzo del metodo microarray GeneTop Meat™ in confronto all'utilizzo di metodi PCR per l'identificazione di specie zoologiche ha rivelato alcune caratteristiche gradite:

- 1) rapidità di esecuzione. La prova richiede solo 3 ore per essere completata in confronto alla maggiore laboriosità necessaria per l'esecuzione di 5 separate analisi in PCR una per ogni specie considerata;
- 2) facilità di esecuzione soprattutto in caso di un elevato numero di prove da effettuare;
- 3) costi contenuti;
- 4) lettura automatizzabile e non prona ad interpretazione individuale.

L'applicazione del metodo microarray GeneTop Meat™ ai “campioni puri” derivanti dalle specie zoologiche non rilevate dalla metodica (cavallo, coniglio, bufalo, renna, cervo, capriolo, cinghiale e pesce), ha evidenziato la presenza di falsi positivi per quanto riguarda il cervo, la renna e il capriolo che reagiscono positivamente per la specie ovina. Un simile risultato è stato ottenuto con DNA derivante da cinghiale che produce un segnale positivo per suino. Non sono state evidenziate cross-reazioni con le altre specie esaminate. Non è stata evidenziata, inoltre, nessuna cross-reazione bovino/bufalo nonostante l'affinità filogenetica tra due specie. Il risultato ottenuto per quanto concerne i parametri di sensibilità e ripetibilità (100%) e concordanza (97,6% e 100% per caprino) conferiscono al metodo buone caratteristiche di robustezza. Per quanto riguarda la valutazione del LOD la quantità minima di DNA (3,13 ng) utilizzata nei controlli di reazione (C1-C5) è stata correttamente evidenziata da entrambi i metodi utilizzati. Dai risultati ottenuti si può concludere che il metodo microarray GeneTop Meat™:

- identifica correttamente la specie zoologica nel 100% dei casi;
- ha una buona capacità discriminante fra le specie filogeneticamente affini bovino e bufalo;
- ha un'ottima capacità di identificare la specie zoologica presente nell'alimento.

I kit the GeneTop Meat™, valutato nel presente studio, si attesta idoneo alla la rapida identificazione di specie zoologiche di maggiore rilevanza nell'industria alimentare finalizzata alla lotta contro le frodi; inoltre si è dimostrata una tecnica applicabile sia su alimenti freschi che trasformati, con l'eccezione di alimenti complessi e altamente processati come nel caso dei mangimi per animali e baby food per i quali anche i metodi PCR utilizzati hanno dato risultati contrastanti.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Dalmasso A., et al. 2004. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Molecular and Cellular Probes*. 18: 81–87
- 2 Dennis M. J. 1998. Recent developments in food authentication. *Analyst*. 123: 151R–156R
- 3 Gizzi G., van Raamsdonk L.W.D, Baeten V., Murray I., Berben G., Brambilla G. & von Holst. 2003. An overview of tests for animal tissues in feeds applied in response to public health concerns regarding bovine spongiform encephalopathy. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 22(1):311-331
- 4 Reyes-Lopez, M.A., A. Mendez-Tenorio, R. Maldonado-Rodriguez, M.J. Doktycz, J.T. Fleming, and K.L. Beattie. 2003. Fingerprinting of prokaryotic 16S rRNA genes using oligodeoxyribonucleotide microarrays and virtual hybridization. *Nucleic Acids Res.* 31:779-789.
- 5 Russo, E. 2003. The microarray family tree. *The Scientist*. 17 (16):29-31.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali delle Regioni Umbria e Marche, Piemonte Liguria e Valle d'Aosta, Lombardia ed Emilia Romagna per aver gentilmente fornito i metodi PCR.

UTILIZZO DEL METODO MICROARRAY PER L'IDENTIFICAZIONE DELLE SPECIE ZOOLOGICHE NEI KEBAB

Varcasia B. M., Cesarano D., Scaramella L., Bilei S., De Santis P.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle regioni Lazio e Toscana - Roma

Keywords: microarray, frode alimentare, kebab

SUMMARY

Döner kebab is a traditional Middle East meat product from slices of meat interleaved with layers of raw meat resembling minced meat, marinated and impaled on a döner kebab stick respectively and shaped into a cone. In this study we evaluate the composition of kebab using a commercially available microarray kit for the detection of species substitution.

INTRODUZIONE

Il "kebab" (conosciuto anche come gyro, donair, dona kebab, souvlaki, chawarma or shawirma o "kebab") è un piatto tradizionale del Medio Oriente a base di carne (solitamente agnello e manzo, montone o pollo, esclusa quella suina), la quale viene tagliata a fettine, viene impilata su di uno spiedo metallico fino a formare un grosso cilindro a cono sulla cui sommità vengono infine infilzate parti grasse che si sciolgono con il calore (1, 2, 3, 6). Il kebab è messo a ruotare vicino ad una fonte di calore e, man mano che la parte esterna del cilindro si cuoce, la carne viene tagliata con un coltello e posta in un panino, in una piadina o servita in un piatto.

Le principali tipologie commerciali di kebab sono: (1) "sish kebab" spiedini di carne (generalmente d'agnello); (2) "çöp sis" spiedini molto piccoli di carne d'agnello montati su stecchi di bambù; (3) "adana kebab" spiedini di carne trita (köfte); (4) "döner kebab" il cono di carne.

Dagli anni settanta in poi, il kebab è diventato il "fast food" più diffuso, sicuramente per il basso costo ma anche per il suo sapore particolare di carattere esotico e la praticità d'uso. Per frodi alimentari, sia essa sanitarie che commerciali, si definiscono la produzione ed il commercio di alimenti non "conformi a quanto dichiarato". Le frodi sanitarie (artt. 442 e 444 del Codice penale) vanno a ledere la salute del consumatore a differenza di quelle commerciali (art. 515 del Codice Penale) che lo ledono solo nei suoi diritti contrattuali e patrimoniali.

Un'analisi condotta in Inghilterra da un gruppo di scienziati e nutrizionisti nel 2008 ha rivelato che "più del 50% dei döner kebab contiene carne diversa da pollo o vitello [...] tra cui quella di pecora o maiale[...]" (4). Da qui nasce l'esigenza da parte dei Servizi Veterinari, nel corso di controlli ufficiali o autocontrolli, di richiedere l'identificazione di specie zoologica per il controllo di quanto dichiarato in etichetta. A tal fine è utile disporre di metodi analitici, come i metodi biomolecolari, sensibili, specifici e capace di evidenziare DNA degradato dai numerosi trattamenti che avvengono durante la trasformazione degli alimenti e presente anche in quantità, minime appartenente alle specie zoologiche di uso comune nella formulazione degli alimenti. Nel presente studio sono stati analizzati campioni di kebab con il kit GeneTop Meat™ (LifeLineLab, Italia) basato sul sistema microarray per la rilevazione di cinque specie zoologiche (avicolo, bovino, caprino, ovino, suino e pesce), alcune delle quali rientrano nella composizione dei kebab.

MATERIALI E METODI

Materiali di riferimento: sono costituiti da carne derivante dalle singole specie zoologiche d'interesse (avicolo, bovino, caprino, ovino e suino) e sono definiti "campioni puri".

Campioni: tra il 2010 ed il 2011 sono stati esaminati 44 campioni di kebab, prelevati presso gli esercizi di vendita in tutto il territorio di Roma dai servizi veterinari delle ASL di competenza.

Estrazione del DNA da materiali di riferimento e campioni:

il DNA è stato estratto da tutti i campioni utilizzando un sistema automatizzato MagCore® Genomic DNA Tissue Kit (Resnova, Italia), quantificato mediante spettrofotometro SmartSpec Plus (BIO-RAD, Italia) e standardizzato alla concentrazione di 20 ng/µl.

Microarray: il protocollo microarray è stato effettuato seguendo le istruzioni del kit GeneTop Meat™, che prevede: (1) PCR del DNA estratto-1,5h (2) denaturazione del prodotto PCR a 95°C-3min. (3) ibridazione a 50°C-40min. (4) lavaggi-5min. (5) reazione con streptavidina-fosfatasi alcalina a 50°C-20min. (6) colorazione con cromogeno-10min. (7) lettura e interpretazione dei risultati per confronto diretto tra gli "spot" accesi e lo schema fornito con il kit.

RISULTATI

Dei 44 campioni, solo il 79% ha prodotto risultati confrontabili con quanto dichiarato in etichetta (Tabella 1).

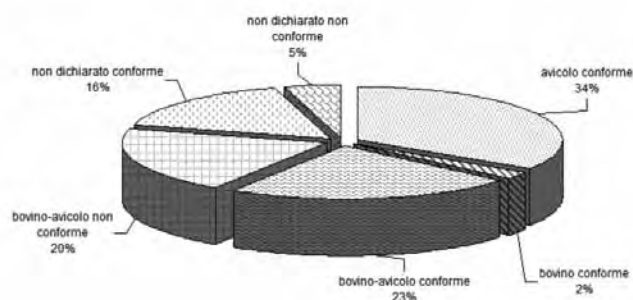
Tabella 1: Campioni di kebab analizzati

Dichiarato in etichetta	N. campioni	Specie			
		Bovino	Ovino	Avicolo	Suino
Pollo	1	-	-	presente	-
Pollo-tacchino	13	-	-	presente	-
Tacchino	1	-	-	presente	-
Vitello	1	presente	-	-	-
Vitello- pollo-tacchino	1	presente	-	presente	-
Vitello-tacchino	9	presente	-	presente	-
Vitello-tacchino	9	assente	-	presente	-
Non dichiarato	3	-	-	presente	-
Non dichiarato	4	presente	-	presente	-
Non dichiarato	1	-	-	presente	presente
Non dichiarato	1	presente	-	presente	presente

Come si evince dal Grafico 1, il 75% rappresenta la percentuale dei campioni risultati conformi. Tra questi il 59% rientrano nella categoria dei kebab di cui è possibile risalire alla tipologia di carne utilizzata, mentre il 16 % rappresenta

la percentuale dei campioni per i quali non è dichiarato nulla. Per quest'ultimi, non potendo risalire ad alcuna informazione certa, conformità è data confrontando i risultati ottenuti con quanto è riportato in bibliografia.

Figura 1: Distribuzione percentuale dei campioni di kebab analizzati



Tra i campioni non conformi (25%), il 5% contiene carne suina, il restante 20% risulta non conforme per l'assenza di carne bovina dichiarata in etichetta.

Il 21% dei campioni deriva da prelievi effettuati presso le attività commerciali per i quali non è stato possibile rintracciare l'etichetta. I risultati positivi ottenuti non sono confrontabili con nessuna informazione inerente la specie zoologica utilizzata nella preparazione dei kebab.

CONCLUSIONI

Nonostante la sostituzione di specie sia considerata una frode commerciale e quindi punibile con sanzioni, in quanto finalizzata ad illecito profitto a danno del consumatore, non va sottovalutato l'aspetto delle allergie alimentari, in quanto alimenti proteici, le carni, possono causare reazioni allergiche in persone particolarmente "sensibili". La carne di suino, tra le varie specie zoologiche, è annoverata tra le cause più frequenti di allergia, per cui la presenza di tale carne nell'alimento in questione può essere ascrivibile sia

nel campo delle frodi sanitarie che commerciali. (5)

Dai risultati ottenuti si può concludere che su 44 campioni analizzati 11 sono non conformi a quanto dichiarato in etichetta. La positività alla carne suina in 2 campioni trova riscontro nella bibliografia disponibile, che segnala un valore del 35% dei campioni esaminati non conforme a quanto dichiarato in etichetta. Le non conformità includono anche la presenza di carne suina vietata dalla religione musulmana (4).

In relazione al diritto del consumatore di essere informato mediante il sistema di etichettatura, non deve essere sottovalutato il risvolto sociale legato alla presenza di alimenti proibiti ad alcune etnie, soprattutto in relazione alla presenza non dichiarata di carne di maiale, che quindi lede il diritto di scelta degli individui.

In fine per quanto riguarda il sistema microarray, data la semplicità d'uso, la rapidità di svolgimento, la sensibilità e la specificità, può essere considerato un metodo affidabile da utilizzare nella routine per l'identificazione di specie zoologica in alimenti di origine animale siano essi crudi che manipolati come nel caso dei kebab.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Institute of Turk Standards (1995a). Döner kebab-raw (uncooked). The number of Turk Standards: 18859, Ankara, Turkey.
- (2) Jöckel & Stengel, 1984. Döner kebab-Untersuchung und beurteilung einer türkischen spezialität. Fleischwirtschaft, 64(5), 527-540.
- (3) Kılıç, B. (2003). Effect of microbial transglutaminase and sodium caseinate on quality of chicken döner kebab. Meat Science, 63(3), 417-421.
- (4) L.A.C.O.R.S (2009). The composition and labelling of döner kebabs.
- (5) Todd, E. C. D., Szabo, R., & Spiring, F. (1986). Donairs (gyros)-potential hazards and control. Journal of Food Protection, 49(5), 369-377.
- (6) Vazgecer B. et al. (2004). Microbiological and chemical qualities of chicken döner kebab retailed on the Turkish restaurants. Food Control 15, 261-264

VALUTAZIONE DEI 7 ANNI DI ATTIVITA' DEL PIANO DI CONTROLLO IBR IN PIEMONTE

Vitale N.¹, Massa M.¹, Masoero L.², Possidente R.¹, Rosso F.³, Crisafulli A.¹, Travaglio S.¹, Chiavacci L.¹¹ S.S. Osservatorio Epidemiologico, IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta² S.C. Laboratorio di Virologia, IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta³ Regione Piemonte- Settore Prevenzione Veterinaria**Key words:** IBR, herds, Piedmont**SUMMARY**

Bovine herpes virus 1 (BHV-1) is primarily associated with clinical syndromes such as rhinotracheitis, pustular vulvovaginitis and balanoposthitis in bovine species. Several European countries have BHV-1 eradication plan as significant losses incurred by disease and trading restrictions. In order to control BHV-1 spread a voluntary control plan against BHV-1 was stated in 2003 in Piedmont. Data were analyzed from 2003 to 2010. Statistical analysis was performed to assess the health status of herds. Results describe a positive progression of the plan.

INTRODUZIONE

La Rinotracheite Infettiva del Bovino (IBR) è una malattia infettiva sostenuta da un virus erpetico (BHV-1). Clinicamente si può manifestare in diverse forme, sebbene la più frequente sia quella respiratoria. L'infezione induce nell'animale lo stato di portatore latente: in occasione di situazioni di stress, come il trasporto, il parto o rimescolamenti di animali, il soggetto infetto ridiventa contagioso ed elimina il virus nell'ambiente. Aborti, calo nella produzione di latte fino al 90%, costi della vaccinazione, forti restrizioni commerciali sono alcuni esempi di perdite economiche legate a questa malattia. Per questi motivi, da decenni sono attivi in tutta Europa piani di controllo ed eradicazione dell'IBR. (4)

La Regione Piemonte, con Deliberazione della Giunta Regionale del 30/12/02 n. 24-8144, ha emanato il "Programma regionale di profilassi della Rinotracheite Infettiva Bovina" (1) che dispone misure obbligatorie di profilassi dell'IBR per gli allevamenti da riproduzione piemontesi e prevede la facoltà, da parte di allevatori interessati, di aderire su base volontaria ad un programma di controllo ed eradicazione della malattia. (2)

In particolare, la Deliberazione del 2002 ha previsto:

- controllo sierologico, nei 30 giorni precedenti lo spostamento, dei bovini di età superiore ai 12 mesi destinati ad allevamenti di riproduzione del Piemonte; l'esito dell'esame deve essere riportato sulla dichiarazione di provenienza che accompagna l'animale durante il trasporto (modello 4);
- controllo sierologico, con esito favorevole, dei bovini di età superiore ai 12 mesi provenienti da altre Regioni e Province Autonome e dall'Estero (all'origine o a destino);
- nelle aziende aderenti, divieto di introduzione dei bovini positivi;
- divieto di alpeggio promiscuo tra aziende con e senza qualifica.

Inoltre, la Direttiva 1/2004/27.03 sottolinea l'importanza dell'adozione di misure di profilassi diretta (biosicurezza) e, qualora necessario, indiretta (vaccinazione), con la finalità di evitare il rischio di introduzione dell'agente eziologico in azienda e la sua trasmissione all'interno della mandria.

Al fine di limitare la diffusione della malattia e ridurre i fattori di rischio per gli allevamenti che hanno intrapreso il programma di eradicazione, è stato successivamente disposto con Deliberazione di Giunta n. 46-8919 del 4/6/2008 il divieto di commercializzazione nel territorio regionale di bovini da riproduzione positivi all'infezione ed il divieto di utilizzo di vaccini interi vivi attenuati, che, oltre a non consentire una valutazione del reale stato sanitario dell'animale, possono potenzialmente riattivarsi nei capi vaccinati, determinando una persistenza dell'infezione nella popolazione. (3) Con lo stesso provvedimento si è provveduto a richiedere l'obbligatorietà di

adesione al piano per gli allevamenti da riproduzione della provincia del Verbano Cusio Ossola, in cui il numero degli aderenti a fine del 2007 era del 92%.

Per valutare la situazione epidemiologica nei confronti di BHV1 in Piemonte dopo 7 anni di piano è stato condotto uno studio che ne analizza l'andamento dal 2003 al 2010.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati e confrontati i dati estratti dal database presente in IZSPLV (SIGLA) per la gestione degli esami di laboratorio con il database ARVET (Anagrafe Regionale Veterinaria) relativi agli allevamenti risultati aderenti al piano IBR Regione Piemonte da gennaio 2003 a dicembre 2010.

Lo stato sanitario del capo nei confronti dell'IBR è stato valutato con le seguenti metodiche: ELISAgB per la ricerca degli anticorpi anti glicoproteina B (IDEXX®), ELISA indiretta per anticorpi totali, ELISAgE per la ricerca degli anticorpi anti glicoproteina gE (IDEXX®); in casi particolari, è stata eseguita la sieroneutralizzazione. Lo schema di classificazione del capo è riportato in tabella 1.

Tabella 1 schema classificazione capo

CLASSIFICAZIONE CAPO	
NEGATIVO	se negativo ELISA anticorpi totali e/o ELISA gB, e negativo gE
POSITIVO	se positivo ad ELISA anticorpi totali e/o ELISA gB e/o ELISA gE
gE-	se negativo a gE e positivo ad anticorpi totali e/o gB
DUBBIO	se dubbio a gE e ad anticorpi totali e/o gB

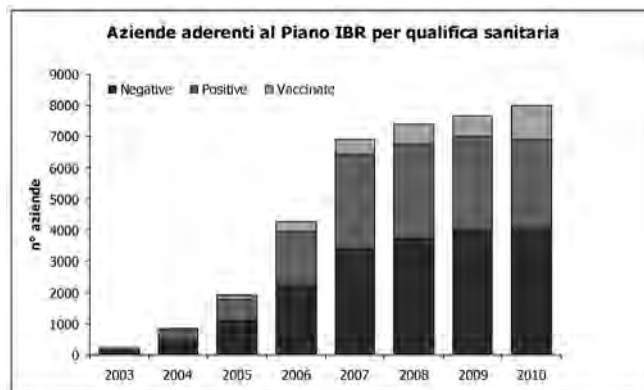
Sulla base della classificazione del capo, le aziende sono state distinte in positive, se presente anche solo un capo positivo, negative, se tutti i capi presenti sono negativi, e vaccinate, se presenti capi gE- (assenza di positivi, capi vaccinati con vaccino deletto).

L'analisi statistica è stata eseguita con il software SAS.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati del piano sono rappresentati nel grafico 1 & 2 e nella tabella 2.

Grafico 1: numero di aziende aderenti al piano IBR in Piemonte negli anni 2003-2010 stratificato per qualifica sanitaria



Dal 2003 al 2010 il numero di allevamenti aderenti al piano è costantemente aumentato (tabella 2).

Nel 2003 gli allevamenti aderenti rappresentavano l'1.6% (246/15.163) delle aziende da riproduzione, nel 2010 sono il 69.5% (7996/11.510). L'adesione in tutte le province piemontesi ha superato il 50%; il range spazia dal 51% della provincia di Alessandria al 99% di Verbano Cusio Ossola.

Grafico 2: percentuale di aziende negative, positive e vaccinate per anno

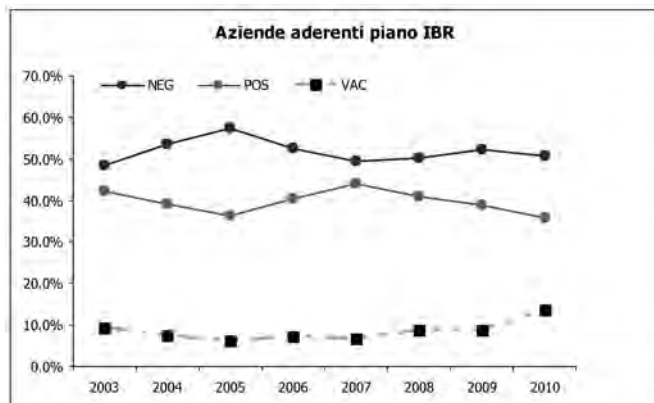


Tabella 2: il numero assoluto di aziende aderenti al piano IBR Piemonte negli anni in base alla qualifica sanitaria

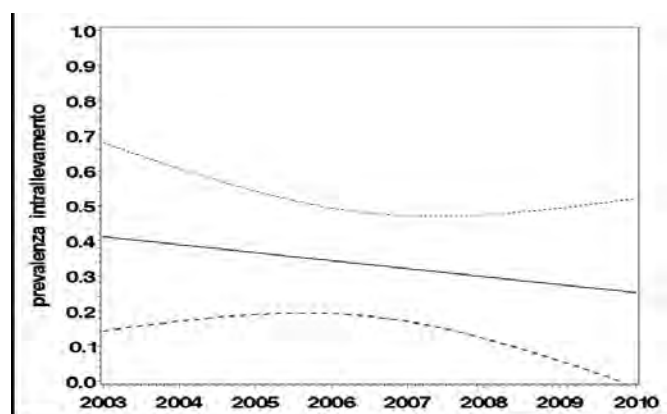
Qualifica Aziende aderenti	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Negative	119	465	1099	2232	3403	3727	4017	4059
Positive	104	341	698	1726	3040	3041	2995	2851
Vaccinate	23	64	120	302	460	656	677	1086
TOTALE	246	870	1917	4260	6903	7424	7689	7996

Dal 2003 al 2010 si osserva in termini assoluti un costante aumento di allevamenti negativi e vaccinati (tabella 2).

Per un'analisi dei risultati che sia più consistente ai fini dell'andamento del piano, è utile esaminare i dati a partire dal 2007, anno in cui l'adesione interessa la maggioranza (54,5%; 6903/12662) degli allevamenti piemontesi.

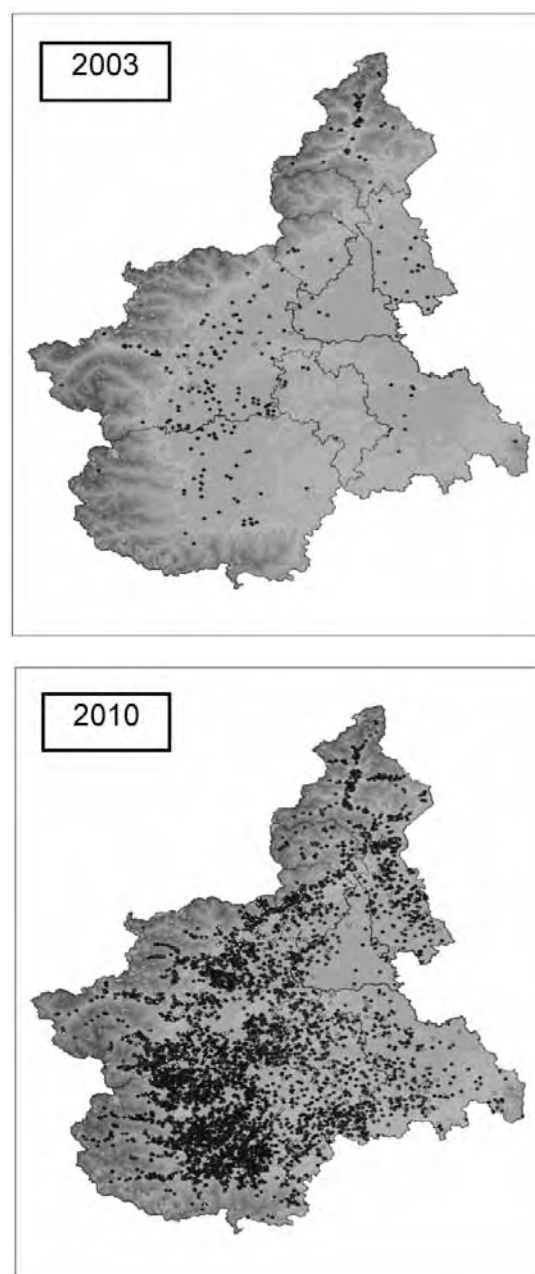
Si osserva un calo costante e regolare delle aziende positive: nel 2007 rappresentano il 44,04% degli aderenti (3040/6903) nel 2010 sono il 35,66% (2851/7996). E' stata confrontata la percentuale di aziende positive nel 2007 e nel 2010: la riduzione delle aziende positive è statisticamente significativa ($\chi^2 = 247.6$; $p < 0.001$).

Grafico 3: Trend della prevalenza intrallevamento media per anno con intervallo di confidenza



Sicuramente, adottare nella maggior parte degli allevamenti piemontesi misure di biosicurezza appropriate, indispensabili per aderire al piano, permette di migliorare lo stato sanitario degli stessi, riducendo i rischi dell'ingresso o riattivazione dell'infezione. La progressiva eliminazione dei capi positivi e l'attuazione di misure di protezione aggiuntive porteranno ad un'ulteriore diminuzione degli allevamenti positivi, sebbene ad oggi alcune positività siano ancora legate all'utilizzo negli anni passati di vaccini non deleti.

Figura 1: allevamenti aderenti al piano volontario IBR



BIBLIOGRAFIA

- 1) Deliberazione della Giunta Regionale 30 Dicembre 2002, n.24-8144 - Programma regionale di profilassi delle rinotracheite infettiva bovina (IBR).
- 2) Deliberazione di Giunta n. 46-8919 del 4/6/2008
- 3) Direttiva 1/2004/27.03 - Programma regionale di eradicazione e profilassi della rinotracheite infettiva bovina (IBR).
- 4) Straub OC. BHV1 infections: relevance and spread in Europe Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 1991;14(2):175-86.

VALUTAZIONE DEL RISCHIO DA RADIAZIONI OTTICHE ARTIFICIALI (ROA)

Vitelli B. R.¹, Sini S.², Saezza M. E.¹, Cenci F.², Severini S.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

²LUSIOS s.r.l. Perugia

Key words: Sicurezza sul lavoro, valutazione del rischio

SUMMARY

The present study reports the results of risk assessment from exposure to Artificial Optical Radiation according to D. Lgs. 81/08 – Testo Unico (T.U.) concerning safety at work.

INTRODUZIONE

L'evoluzione tecnologica ha sostanzialmente cambiato gli ambienti di lavoro evidenziando nuovi fattori di rischio per i lavoratori ed inducendo il legislatore ad occuparsi dell'esposizione a questi agenti.

È questo il caso delle Radiazioni Ottiche Artificiali (ROA), le cui prescrizioni di sicurezza e di salute per i lavoratori sono contenute nel D. Lgs. 81/08 – Testo Unico (T.U.) in materia di sicurezza sul lavoro - e sono entrate in vigore il 26 aprile del 2010.

Scopo di questo lavoro è presentare i risultati della valutazione del rischio da esposizione alle ROA effettuata sulla base delle indicazioni contenute nel T.U., il quale fornisce le modalità per calcolare l'esposizione stessa e introduce i valori limite, definiti come limite di esposizione alle radiazioni ottiche, basati direttamente sugli effetti sulla salute accertati e su considerazioni biologiche.

MATERIALI E METODI

Per effettuare una corretta valutazione, sono state identificate tutte le sorgenti di pericolo, sulla base dell'analisi del processo produttivo e dell'organizzazione del lavoro. Sono state, pertanto, acquisite tutte le informazioni relative alle macchine e alle attrezzature che utilizzano le ROA. Per ogni sorgente individuata è stata determinata l'esposizione dei lavoratori potenzialmente coinvolti. Per tali tipologie di radiazioni, l'Allegato XXXVII al D.Lgs. 81/2008 e s.m.i. prevede che il calcolo sia effettuato con le seguenti formule:

$$E_{\text{eff}} = \sum_{\lambda=180 \text{ nm}}^{\lambda=400 \text{ nm}} E_{\lambda} \cdot S(\lambda) \cdot \Delta\lambda \quad \text{e} \quad H_{\text{eff}} = E_{\text{eff}} \cdot \Delta t$$

dove:

$E_{\lambda}(\lambda, t)$ E_{λ} *irradianza spettrale o densità di potenza spettrale: la potenza radiante incidente per unità di area su una superficie, espressa in watt su metro quadrato per nanometro [$W m^{-2} nm^{-1}$]; i valori di $E_{\lambda}(\lambda, t)$ ed E_{λ} sono il risultato di misurazione o possono essere forniti dal fabbricante delle attrezzature;*

E_{eff} *irradianza efficace (gamma UV): irradianza calcolata nell'intervallo di lunghezza d'onda UV da 180 a 400 nm, ponderata spettralmente con $S(\lambda)$, espressa in watt su metro quadrato [$W m^{-2}$];*

H_{eff} *esposizione radiante efficace: esposizione radiante ponderata spettralmente con $S(\lambda)$, espressa in joule su metro quadrato [$J m^{-2}$];*

$S(\lambda)$ *fattore di peso spettrale: tiene conto della dipendenza dalla lunghezza d'onda degli effetti sulla salute delle radiazioni UV sull'occhio e sulla cute;*

$t, \Delta t$ *tempo, durata dell'esposizione, espressi in secondi [s];*

λ *lunghezza d'onda, espressa in nanometri [nm];*

$\Delta\lambda$ *lunghezza di banda, espressa in nanometri [nm], degli intervalli di calcolo o di misurazione*

Il calcolo proposto viene effettuato con i dati tratti da schede tecniche e/o riportate sulle attrezzature stesse.

Attraverso le suddette formule è stato calcolato:

- il valore di esposizione dell'addetto dovuta ad un evento accidentale;

- il tempo massimo che una persona può essere esposta senza superare il valore limite di esposizione.

RISULTATI

Dai calcoli è risultato che:

- l'esposizione accidentale risulta molto inferiore al limite definito dalla normativa (valore ottenuto 7,6 J/mq a dispetto del limite di 30 J/mq);

- il tempo massimo in cui si può essere esposti al tipo di sorgente in oggetto senza subire conseguenze è di 39 s.

Effettuata la valutazione, è stato redatto il relativo documento che contiene le misure migliorative, peraltro minime, da attuare. Sia il valore dell'esposizione che il relativo valore limite risultano essere direttamente proporzionali al tempo di esposizione alle ROA e alle caratteristiche intrinseche della sorgente.

Analizzando le modalità operative con cui vengono utilizzate le sorgenti presenti, si può concludere che non c'è superamento del valore limite di esposizione dei lavoratori alle ROA.

DISCUSSIONE

Le radiazioni ottiche sono tutte le radiazioni elettromagnetiche nella gamma di lunghezza d'onda compresa tra 100 μm e 1 mm.

La natura delle ROA è tale che l'energia si deposita sui tessuti superficiali dell'uomo e quindi gli organi più a rischio risultano essere l'occhio e la pelle.

Dall'analisi effettuata sulle tipologie di ROA presenti nelle varie sedi dell'Istituto (ad esempio lampade germicide a raggi UV, monitor dei computer, fotocopiatrici, cartelli di segnalazione, ecc.) è emerso che solo le lampade germicide necessitano di una valutazione approfondita.

Le lampade germicide non vengono utilizzate in presenza dell'operatore; esse vengono accese solo dopo che l'operatore ha terminato il suo lavoro, al fine di sterilizzare l'ambiente/piano di lavoro. Le lampade sono tutte ad accensione manuale, funzionanti secondo il fabbisogno dello stesso laboratorio.

Inoltre, un'eventuale esposizione accidentale ed erronea

risulterebbe comunque estremamente limitata nel tempo, dal momento che le radiazioni emesse dalle lampade sono facilmente percepibili dall'uomo in quanto molto fastidiose.

Le lampade delle cappe a flusso laminare entrano in funzione solo dopo aver chiuso lo sportello anteriore della cappa stessa, impedendo fisicamente che l'operatore venga a contatto con le ROA.

Dalla valutazione emerge che l'unica misura migliorativa che può essere attuata è l'effettuazione di formazione e informazione agli addetti interessati.

Per una maggior tutela, si può affiggere all'esterno dei locali in

cui vi è presenza di lampade germicide un cartello indicante il pericolo di esposizione, corredato da indicazioni sintetiche e minime sui tempi di esposizione consentiti o sulle modalità di utilizzo delle lampade stesse.

La valutazione dei rischi derivanti da esposizioni alle ROA è programmata ed effettuata, con cadenza almeno quadriennale.

BIBLIOGRAFIA

Decreto Legislativo n. 81/2008 – Testo Unico in materia di sicurezza sul lavoro

STRESS OSSIDATIVO E ONCOLOGIA COMPARATA: ANALISI PRELIMINARE DI MARCATORI SPECIFICI IN ANIMALI DOMESTICI

**Vito G., Bassi A. M.¹, Scanarotti C.¹, Brambilla G.², Schiavetti I., Turno P.³, Gotelli S.⁴,
Ratto A., Campanella C., Cosma V., Ferrari A.**

Centro di Riferenza Nazionale per l'Oncologia Veterinaria e Comparata (CEROVEC) – Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta; ¹Dipartimento di Medicina Sperimentale (DIMES), Università degli Studi di Genova; ²Istituto Superiore di Sanità, Roma; ³Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno (IZSM), Napoli. ⁴Azienda Sanitaria Locale (A.S.L.3), Genova.

Key words: stress ossidativo, ROS, Antiossidanti.

SUMMARY - The aim of this study is the evaluation of oxidative stress in dogs and cats with tumors. The analysis have been performed on samples of serum, collected by the National Reference Centre for Veterinary and Comparative Oncology (CEROVEC). We used two commercial kits: d-ROMs Test to measure the reactive oxygen metabolites (ROS) and anti-ROMs Test, to evaluate the antioxidant potential. We classified the cases on the basis of sizes, sex and tumors types. We compared the values of clinical cases with negative controls, represented by healthy animals.

INTRODUZIONE - Recentemente in Medicina Umana e Veterinaria, è sempre più forte l'interesse nei confronti dello stress ossidativo, uno stato biochimico cellulare derivato da una elevata produzione di radicali liberi, la cui pericolosità è associata alla forte reattività nei confronti di altre molecole, e alla alterazione quantitativa o qualitativa, di agenti antiossidanti. Negli organismi viventi, l'ossigeno molecolare costituisce la principale fonte di radicali liberi, noti come specie reattive dell'ossigeno (ROS), prodotti principalmente nel corso del trasporto di elettroni a livello mitocondriale (1-2).

I ROS intervengono in numerose funzioni cellulari, tra cui i meccanismi di difesa immunitaria e di trasduzione del segnale. Alti livelli di ROS inducono un danno ai principali costituenti della cellula, compromettendone pertanto le funzionalità, fino a giungere in alcuni casi alla morte della stessa per necrosi o apoptosi.

Molti studi hanno sottolineato l'associazione tra stress ossidativo e alcuni stili di vita (3), (quali il fumo di sigaretta, l'abuso di alcool e l'assunzione di farmaci), nonché numerose patologie, tra le quali: l'ipertensione, il diabete, l'aterosclerosi, l'infarto e le neoplasie. In quest'ultimo caso le cellule tumorali sono caratterizzate da un accelerato metabolismo glicolitico, responsabile di insorgenza di stress ossidativo (4).

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare, mediante l'utilizzo di specifici kit commerciali, lo stato ossidativo in animali da compagnia affetti da tumore, in particolare nel cane e nel gatto, che rappresentano da una parte ottimi modelli di studio per l'applicazione di protocolli terapeutici e dall'altra rivestono il ruolo di sentinella nei confronti di agenti esogeni potenzialmente pericolosi per la salute animale e umana.

MATERIALI E METODI - Lo studio è stato condotto su campioni di siero di cani e gatti con neoplasie, raccolti presso il Centro di Riferenza Nazionale per l'Oncologia Veterinaria e Comparata (CEROVEC), a seguito della collaborazione con Studi veterinari operativi nella provincia di Genova. Nelle fasi preliminari è risultata fondamentale l'attività di formazione dei Medici Veterinari partecipanti al Progetto; a tal proposito sono state predisposte specifiche schede per l'anamnesi e per il follow-up dei pazienti. Le analisi sono state eseguite mediante l'utilizzo di due kit commerciali (DIACRON INTERNATIONAL, Grosseto): il d-ROMs Test (Figura 1) e l'anti-ROMs Test (Figura 2) e di uno specifico fotometro, FREE Carpe Diem (FREE) (Figura 3).

Il d-ROMs Test misura la capacità ossidante del plasma o del siero, da imputare principalmente alla presenza di radicali alcolossili e idropersossili. L'anti-ROMs Test valuta invece la capacità antiossidante del campione, in base all'attività ferro riducente. Il principio dell' anti-ROMs Test si basa su una reazione a due fasi, che consente di determinare il potere antiossidante delle difese rapide (ad esempio le vitamine C ed E) e di quelle lente (di cui fanno parte ad esempio alcuni tioli).

I controlli negativi sono rappresentati da cani e gatti sani.

Agli animali è stato eseguito un primo prelievo ematico, prevalentemente dalle vene cefalica, safena o giugulare, in corso di intervento chirurgico per l'asportazione della massa neoplastica. Dopo immediata centrifugazione, è stato ottenuto il campione sierico, processato in giornata, o conservato alla temperatura di -20°C.

Ogni paziente è stato monitorato nel tempo, tramite un dosaggio, eseguito dopo circa una settimana dall'intervento chirurgico, 1 e 6 mesi, un anno, e con scadenze variabili in caso di trattamenti farmacologici.

Figura 1. Kit commerciale d-ROMs Test.



Figura 2. Kit commerciale ANTI-ROMs Test.



Figura 3. FREE Carpe Diem (FREE)



RISULTATI - I casi raccolti e archiviati presso il CEROVEC, sono stati classificati in base alla taglia, al sesso e alla tipologia tumorale.

I risultati di d-ROMs e anti-ROMs dei controlli negativi, sono stati utilizzati per identificare il range di normalità, sia per il cane che per il gatto. I valori ottenuti sono stati confrontati con quelli derivati dai casi clinici oggetto dello studio.

DISCUSSIONE - In campo oncologico, sono molteplici le potenzialità derivate da studi sullo stress ossidativo; il monitoraggio della produzione di radicali liberi in popolazioni animali o umane esposte ad alcuni fattori ambientali, potrebbe fornire utili indicazioni sul possibile ruolo di tali agenti sull'insorgenza e progressione della patologia tumorale, con notevole impatto in ambito preventivo e terapeutico.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Jun Fang, Takahiro Seki, Hiroshi Maeda, 2009, Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation, *Advanced Drug Delivery Reviews* 61, 290-302.
2. Kenneth Maiese, Zhao Zhong Chong, Jinling Hou, Yan Chen Shang, 2010, Oxidative stress: Biomarkers and novel therapeutic pathways, *Experimental Gerontology* 45, 217-234.
3. Donyaporn Trachootham, Jerome Alexanfre, Peng Huang, 2009, Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?, *Nature Reviews* 8, 579-589.
4. Paolo Degan, Paola Cuccarolo, 2011, Screening analitico per la stima di un danno correlato alla esposizione a noxae ambientali, *Biologi Italiani* 4, 56-63.

RICERCA DI ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI NEGLI ALIMENTI E MANGIMI COMMERCIALIZZATI IN SARDEGNA: RISULTATI E CONSIDERAZIONI

Vodret B., Mancuso M. R., Serratrice G., Oggiano M. A., Mascia I., Marongiu E.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna

Key words: gmo, food and feed, official control

ABSTRACT

Cultivation of genetically modified plants is in continuous expansion and, to date, European Parliament authorised many genetically modified crops and their products. Nevertheless, the majority of the population don't want genetically modified ingredients in food, avoiding GMO foods when they are clearly labelled. In this context, the aim of this work was the analysis of official control results, performed in Sardinia, to verify compliance with current legislation on GMOs food and feed.

INTRODUZIONE

La produzione e la diffusione di piante OGM desta da molto tempo considerevoli preoccupazioni nel consumatore moderno, che ha la caratteristica di essere sempre più attento ed esigente verso i prodotti destinati al consumo umano e all'alimentazione animale. Allo stato attuale sono numerose le piante geneticamente modificate presenti nel mondo: mais, soia, colza, tabacco, cotone, patata, pomodoro, barbabietola da zucchero, papaia e riso.

Nell'Unione Europea ad oggi sono stati autorizzati eventi transgenici di mais, soia, cotone, colza, barbabietola, che possono essere presenti in alimenti e mangimi, ed un evento transgenico di patata i cui residui possono essere destinati all'alimentazione animale. Inoltre per garantire la tracciabilità e l'etichettatura degli organismi geneticamente modificati e dei prodotti ottenuti da OGM, lungo tutta la catena alimentare, il Parlamento Europeo ha emanato due regolamenti (1,2) che obbligano tutti i prodotti geneticamente modificati o contenenti OGM ad essere oggetto di etichettatura. Le informazioni in etichetta consentono al consumatore di essere informato meglio sui prodotti OGM autorizzati destinati al consumo da parte dell'uomo ovvero degli animali, facilitando l'adozione di scelte consapevoli. Tuttavia, malgrado gli sforzi degli operatori per non utilizzare mangimi e alimenti geneticamente modificati, a volte è difficile evitare una contaminazione accidentale con prodotti OGM. Pertanto l'obbligo di etichettatura non viene applicato agli alimenti e mangimi che contengono OGM autorizzati in proporzione non superiore allo 0.9% degli ingredienti, purché venga dimostrato che la loro presenza sia accidentale o tecnicamente inevitabile.

La verifica dell'adempimento alle prescrizioni della normativa vigente in materia di OGM, ed in particolare l'accertamento del rispetto dei requisiti di etichettatura, si realizza mediante controlli effettuati su tutto il territorio nazionale tramite Piani Regionali mirati. Tali Piani derivano dal Piano Nazionale di Controllo Ufficiale sulla presenza di organismi geneticamente modificati negli alimenti (3), e dal Piano Nazionale di Sorveglianza e di Vigilanza Sanitaria sull'alimentazione degli animali "Capitolo 5 - Piano di sorveglianza e vigilanza sulla presenza di organismi geneticamente modificati nei mangimi" (4). Nella nostra Regione le prove ufficiali sui campioni di alimenti e mangimi prelevati dalle Autorità Competenti vengono fatte dal 2001 presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale, unico laboratorio ufficiale riconosciuto in Sardegna. L'obiettivo del presente lavoro è riportare la situazione sull'attività svolta soprattutto negli ultimi anni, allo scopo di fornire una visione sullo stato dell'arte di tale problematica nel nostro territorio.

A tal fine vengono riportati e valutati i risultati dei controlli ufficiali eseguiti sugli alimenti e mangimi dal 2008 ad oggi.

MATERIALI E METODI

Tutti i campioni di alimenti e mangimi pervenuti sono stati prelevati nell'ambito dei Piani Regionali dai Servizi Veterinari o dai Servizi Igiene Alimenti e Nutrizione delle A.U.S.L.

Dal 1 gennaio 2008 al 30 giugno 2011 sono stati analizzati 100 campioni di alimenti ad uso umano e 115 campioni di alimenti ad uso zootecnico, per un totale di 215 campioni.

Come previsto dai piani per la ricerca di OGM, gli ingredienti dichiarati nei campioni prelevati, erano soia e mais e in alcuni casi nei mangimi era presente la barbabietola da zucchero. Tra i campioni di alimenti ad uso umano sono stati prelevati anche dei campioni di riso o che lo contenevano come ingrediente, in seguito a segnalazioni di probabile presenza di riso non autorizzato in Europa.

Figura n.1



Dopo omogeneizzazione dei campioni, è stato estratto il DNA con il metodo CTAB seguito da una purificazione con resina Wizard su colonna (5). Il DNA estratto e purificato, dopo valutazione qualitativa per via spettrofotometrica, è stato utilizzato per le successive prove di amplificazione di PCR real time (Figura 2), effettuate con l'apparecchiatura ABIPRISM 7900 (Fig.3).

Figura n.2. Esempio di grafico di amplificazione di prova di PCR real time

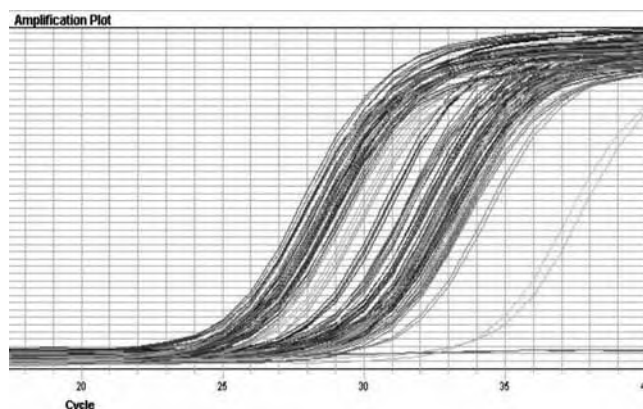


Figura n.3. Apparecchiatura utilizzata per le prove di amplificazione



Tali prove sono state effettuate eseguendo una prima fase di verifica della presenza o assenza dei geni endogeni delle specie vegetali dichiarate; una seconda fase di screening per rilevare la presenza di OGM; una terza di identificazione del transgene specifico; una quarta ed ultima fase riguardante l'eventuale quantificazione dell'OGM specifico identificato. Sono stati utilizzati primers, sonde e programmi di amplificazione dei protocolli sviluppati sia dal Laboratorio Comunitario di Riferimento per gli OGM (6) che dal Laboratorio Nazionale Di Riferimento presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana.

RISULTATI

Tutti gli alimenti ad uso umano analizzati, contenenti soia e mais, dove nell'etichetta non era mai dichiarata la presenza di OGM, sono risultati negativi ai transgeni autorizzati ricercati. Infatti su tutti i campioni, che sono risultati positivi al gene endogeno di interesse, risultato che assicura l'amplificabilità del DNA estratto, non è stata rilevata nessuna positività. Anche gli alimenti ad uso umano di riso o contenenti riso sono risultati negativi.

La situazione per quanto riguarda gli alimenti ad uso zootecnico è risultata leggermente differente. Nei mangimi, non dichiarati OGM in etichetta, non sono stati trovati eventi transgenici, ad eccezione di un campione di granella di mais dove è stata rilevata la presenza di soia transgenica autorizzata Roundup Ready (RR). Nei mangimi dichiarati OGM, dal 2008 al 2010, la presenza della soia Roundup Ready è sempre stata confermata, e raramente è stato rilevato il mais autorizzato MON 810. Mentre nel primo semestre 2011, oltre alla soia, sono stati rilevati gli eventi di mais autorizzati MON810, TC1507, Bt11.

DISCUSSIONE

La ricerca degli OGM negli alimenti e mangimi comporta un notevole impegno per i laboratori ufficiali europei deputati a tale controllo, infatti sono molti gli eventi transgenici che si potrebbero trovare sulle nostre tavole.

Come è noto, gli alimenti e i mangimi geneticamente modificati possono essere immessi sul mercato solo previo rilascio di autorizzazione da parte della Commissione Europea.

Al momento gli eventi autorizzati in Europa sono 45, ma esistono anche gli OGM in fase di autorizzazione, approvati dai Comitati scientifici. Inoltre gli OGM autorizzati nel resto del mondo, ma non in Europa, per un qualche motivo potrebbero essere oggetto di specifiche decisioni comunitarie, come nel caso del riso non autorizzato LL62/LL601.

Le analisi eseguite dal nostro laboratorio hanno riguardato alimenti ad uso umano e mangimi di provenienza regionale, nazionale e internazionale. Su questi campioni abbiamo ricercato, come previsto dai piani regionali, la soia transgenica RR, autorizzata dal 1996, ed altri eventi OGM (mais MON810, GA21, Bt11, DAS59122, TC1507, MON863, NK603, MIR604, la barbabietola H7-1), i cui metodi di prova sono stati da noi messi a punto e

accreditati nel corso degli anni, man mano che gli eventi venivano autorizzati nell'Unione Europea.

I risultati ottenuti dalle analisi, per quanto riguarda gli alimenti ad uso umano, dove non si riscontra mai in etichetta la presenza di OGM, hanno sempre confermato l'assenza di OGM autorizzati e di riso non autorizzato. Tali prodotti, rispettano sostanzialmente i requisiti di etichettatura, assicurando quindi la corretta informazione al consumatore.

Per quanto riguarda i mangimi invece, dove in etichetta è presente il più delle volte la dicitura "presenza di OGM" (soia geneticamente modificata e/o mais geneticamente modificati), tale presenza riguardava la soia RR e in misura minore, soprattutto dal 2011, qualche evento di mais autorizzato non riscontrato prima. Tali campioni risultavano comunque regolamentari rispettando la normativa sull'obbligatorietà dell'etichettatura.

A nostro parere, anche se al momento gli alimenti e i mangimi presenti in Sardegna risultano conformi alla legislazione, è indispensabile continuare con l'impegno da parte del laboratorio per una crescita continua.

Al fine della tutela dei consumatori è necessario l'ampliamento degli eventi già ricercati, con la messa a punto e l'accreditamento di nuovi metodi, anche adottando eventualmente sistemi diversi di indagine multiscreening. Infatti considerando anche la comparsa in Sardegna di eventi transgenici di mais nei mangimi, che sebbene autorizzati non erano presenti negli anni scorsi, ed il continuo aumento di eventi transgenici nel mondo, non è detto che al più presto altri OGM non arrivino nelle nostre tavole. Questo potrebbe essere il caso del primo salmone OGM: un esemplare in cui vengono inseriti un gene del salmone reale e uno dello Zoarces, un pesce viviparo diffuso nell'Atlantico; elementi che gli conferiscono una maggiore velocità di crescita.

Figura n.4



BIBLIOGRAFIA

- 1) Regolamento (CE) N. 1829/2003 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 Settembre 2003 relativo agli alimenti e ai mangimi geneticamente modificati.
- 2) Regolamento (CE) N. 1830/2003 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 Settembre 2003 concernente la tracciabilità e l'etichettatura di organismi geneticamente modificati
- 3) PNOGM, triennio 2009-2011
http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_936
- 4) PNAA, triennio 2009-2011___http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_942
- 5) Milia M. et al.(2008) "Three different extraction methods for detecting Roundup Ready soybean in processed food from the Italian market " International Journal of Integrative Biology 3, 123-130.
- 6) GMO Detection Database Method, GMO Detection Methods Database - Institute for Health and Consumer Protection – (JRC-IHCP), European Commission

CASE REPORT SU UN GRAVE FOCOLAIO DI MASTITE DA MYCOPLASMA BOVIS

Zanardi G.¹, Sorgia E.², Bolzoni G.¹, Rosignoli C.¹, Bertocchi L.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Reparto di Produzione Primaria, Brescia

² Veterinario Libero Professionista

Key words: mastitis, *Mycoplasma bovis*, bovine

SUMMARY

Aim of this work is to describe the occurrence of a serious outbreak of mastitis by Mycoplasma bovis in a dairy herd consisting of about 200 dairy cows.

Thirty cases of clinical mastitis in 14 days occurred at the beginning of March 2011. The mastitis was characterized by hyperthermia (41°C), inappetence, abnormal udder secretion (watery milk with a few clots or colostrum-like material), sudden mark drop in milk production.

The probable origin of the mycoplasmal mastitis outbreak was the purchase of 19 cows and heifers, coming from other Member States. The gravity of the case and the sudden spread of the infection between the lactating cows were enhanced by faulty milking machines (i.e. vacuum fluctuation, milk piping undersized), incorrect management practices (quarantine), milking and improper milking procedures and sanitation (premilking and postmilking teat dipping).

From March to May 2011, 91 diseased cows were found and culled. The milk production decreased of 25% and Somatic Cell Count value doubled till about 400.000/ml.

This outbreak confirms the highly contagious nature of the mastitis by Mycoplasma bovis, the slow recovery rates and the ineffectiveness of treatment.

The sanitary measures applied by the dairy owner have allowed to control the infection in three months, regaining the previous milk production and decreasing the somatic cell count below 300.000/ml.

INTRODUZIONE

Mycoplasma bovis è un patogeno in grado di colonizzare diversi siti dell'organismo del bovino. Prevalentemente viene rilevato a livello delle mucose respiratorie e del tratto urogenitale e più raramente a livello articolare e mammario (2). L'infezione mammaria da *M. bovis*, spesso di origine canalicolare, può avere un decorso clinico o subclinico. Colpisce bovine di ogni età e in qualunque stadio di lattazione e, di solito, l'infezione è persistente e tende a ripresentarsi nelle lattazioni successive. La mastite è refrattaria a trattamenti con antibiotici e spesso tende alla cronicizzazione con conseguente atrofia dei quarti colpiti (2, 3, 5).

L'origine dei focolai di mastite da *M. bovis* è spesso da ricondurre all'introduzione nella mandria di animali infetti, subclinici, a livello mammario. La diffusione intra-allevamento da bovine infette a suscettibili avviene prevalentemente tramite le operazioni di mungitura.

La mastite da *M. bovis* era un evento raro nel passato negli allevamenti da latte del Nord Italia. Negli ultimi anni, invece, i dati dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), indicano un aumento dell'incidenza dei focolai (1). Gli allevamenti colpiti da questa infezione subiscono spesso degli ingenti danni economici per la notevole riduzione della produzione latte e per l'eliminazione dalla mandria degli animali infetti.

Nel presente lavoro viene descritto un grave focolaio di infezione mammaria da *Mycoplasma bovis*, che ha colpito

un allevamento di bovine da latte con 200 capi in mungitura. In particolare, sono dettagliate le misure intraprese per la gestione e la risoluzione dell'infezione.

MATERIALI E METODI

L'esame colturale per la ricerca di *Mycoplasma bovis* nei campioni di latte è stato eseguito secondo il metodo di prova specifico codificato nel sistema qualità dell'IZSLER. In breve, 0,5 ml di latte sono stati posti in 4,5 ml di brodo di arricchimento specifico (PPLO brodo bovino) ed incubati a 37°C con 5-10% CO₂ per 5 giorni. Successivamente il brodo di arricchimento è stato seminato su un terreno agarizzato in piastra specifico per micoplasmi (PPLO agar bovino) ed incubato a 37°C con 5-10% CO₂ per 5 giorni. A partire dal terzo giorno di incubazione la superficie del terreno è stata osservata al microscopio a basso ingrandimento per rilevare l'eventuale presenza di colonie dall'aspetto caratteristico.

Per l'identificazione di *Mycoplasma bovis*, sulle colonie sospette è stato poi applicato un test PCR (4).

Un'indagine epidemiologica *ad hoc* è stata eseguita in occasione del sopralluogo in azienda per la visita clinica dei capi colpiti, allo scopo di evidenziare l'origine dell'infezione e di individuare i fattori favorevoli la rapida diffusione all'interno dell'allevamento.

DESCRIZIONE DEL FOCOLAIO

L'azienda sede di focolaio è ubicata in collina in zona isolata insieme con altri due allevamenti da latte vicini, che sono soci del caseificio cooperativo locale con produzione di Grana Parmigiano Reggiano. Il *corpus* aziendale è costituito da due edifici: quello principale, più recente, in cui sono allevate le bovine da latte in stabulazione libera e una piccola stalla usata per la quarantena, a stabulazione libera in box.

Il numero medio di bovine in lattazione durante l'anno è di circa 200, stabulate su grigliato, con cuccette dotate di lettiera a base di pellet di paglia, senza paddock esterni.

La sala di mungitura è a spina di pesce 8 + 8, in funzione da agosto 2010, in attesa di essere sostituita da una sala a giostra.

Dall'anamnesi sanitaria, l'allevamento nei primi 9-10 mesi del 2010 presenta una situazione sanitaria mammaria accettabile, con una media di due casi clinici acuti o sub-acuti la settimana.

L'infiammazione colpisce di norma un solo quarto della mammella, senza agalassia, e i trattamenti farmacologici portano alla guarigione clinica.

Negli ultimi due mesi del 2010 la situazione migliora, i casi clinici si riducono sensibilmente e il conteggio cellulare nel latte di massa diminuisce intorno a valori di 200.000/ml.

L'unico dato sanitario di rilievo è la presenza di polmoniti da virus respiratorio sinciziale, complicate da Pasteurella.

Non si segnalano artriti o polmoniti nei vitelli.

L'aumento dell'incidenza di mastiti avviene a inizio marzo 2011.

In 15 giorni si registrano 30 nuovi casi, che colpiscono gli animali in lattazione, compreso le primipare.

La sintomatologia della mastite acuta è simile in tutti i capi colpiti e si caratterizza con il coinvolgimento iniziale di un solo quartiere (secreto alterato, coaguli e separazione in due fasi, sierosa e densa), diffondendosi nell'arco di alcuni giorni agli altri quartieri della mammella. Gli animali presentano in diversi casi ipertermia (fino a 41°C) e disappetenza.

La sintomatologia generale migliora nell'arco di tre giorni, ma la sequela è l'agalassia totale. Le bovine colpite sono refrattarie alla terapia antibiotica.

Considerata la mancata guarigione nei primi casi di mastite e l'andamento clinico atipico, il veterinario aziendale dispone l'analisi batteriologica del latte su alcune bovine, compresa la specifica ricerca di micoplasma. *M. bovis* è isolato in 5 su 8 campioni prelevati da quartieri di altrettanti capi con mastite, altri due campioni sono positivi per presenza di *S. uberis* e un campione è negativo. Gli animali con sintomatologia riconducibile a mastite da *M. bovis* sono inviati al macello.

A metà aprile, l'esame batteriologico del latte eseguito su tutte le 157 bovine in mungitura porta all'isolamento e all'identificazione di *M. bovis* in altre sei bovine.

Dal 21 marzo al 20 aprile 2011, 47 bovine colpite da mastite clinica sono riformate e inviate verso il macello.

Da febbraio ad aprile si rileva un calo medio del 25% nella produzione giornaliera di latte (da 25 a 19 litri) parallelamente a un aumento del conteggio delle cellule somatiche da una media di 200.000/ml fino a quasi 400.000/ml.

Il sopralluogo in azienda si effettua il 22 aprile 2011 e individua criticità nel management aziendale, nel funzionamento della macchina mungitrice e n https://fbcdn-sphotos-a.akamaihd.net/hphotos-ak-snc4/37996_139628666067511_100000611356433_234053_5662643_n.jpg e https://fbcdn-sphotos-a.akamaihd.net/hphotos-ak-snc4/40471_142948582402186_100000611356433_247876_814228_n.jpg Il'igiene di mungitura.

Infatti, il controllo dell'impianto di mungitura evidenzia una decisa instabilità del vuoto, dovuto a un sottodimensionamento della tubatura principale del latte.

L'ispezione delle tazze utilizzate per il pre e post dipping mostra uno stato di scarsa igiene e il loro contenuto, composto di un prodotto liquido igienizzante e materiale organico, è contaminato da *M. bovis*.

L'indagine epidemiologica accerta che a metà febbraio 2011 erano state acquistate 19 bovine, 12 pluripare e 7 primipare, di cui 7 provenienti da Francia, 6 da Lussemburgo, 4 da Paesi Bassi, 2 da Germania.

Alla loro introduzione in azienda, le bovine erano state isolate per 15 giorni nella stalla dismessa e munte separatamente con un impianto e un operatore dedicati. Una primipara aveva partorito durante la quarantena e una aveva manifestato mastite con coaguli nel secreto.

Ai primi di marzo le bovine erano state spostate nella stalla principale e, anche se tenute separate dal resto dell'effettivo, erano state munte per prime. Questa evenienza induce a ipotizzare che l'origine dell'infezione coincida con l'introduzione di animali a inizio febbraio, e che si sia diffusa dopo circa un mese in seguito al loro spostamento in azienda a contatto con le altre bovine.

La vasta e rapida propagazione dell'infezione, che ha colpito anche le primipare nate in stalla, è stata facilitata e amplificata dal fatto che gli animali acquistati sono stati munti per primi. La fluttuazione di vuoto che ha favorito il possibile reflusso di latte infetto e la presenza di *M. bovis* nel contenitore del pre-dipping sono stati anch'essi responsabili di diffusione dell'infezione tra le bovine in mungitura.

Le procedure consigliate per contenere ed eradicare l'infezione sono state le seguenti:

- suddivisione delle bovine in tre gruppi: 1) animali negativi con conteggio di cellule basso (< 200.000/ml); 2) animali in attesa della prima diagnosi (dubbi), oppure negativi, ma con conteggio di cellule alto (> 200.000/ml); 3) animali positivi;
- ordine di mungitura: prima le bovine presumibilmente non infette con conteggio di cellule < 200.000, poi quelle dubbie o negative con cellule > 200.00/ml e infine quelle positive per micoplasma;
- prelievo di latte in bovine post parto (pool dei quattro quarti) e in animali colpiti da mastite (campione sterile di quarto) al fine di individuare i soggetti infetti;
- eliminazione delle bovine positive
- miglioramento del livello d'igiene in mungitura, soprattutto per quanto concerne la pulizia delle tazze per il pre e post-dipping;
- utilizzo di tazze per il pre e post dipping differenti nei diversi gruppi di bovine in mungitura;
- uso di guanti durante la mungitura e disinfettarli dopo la mungitura di una bovina sospetta;
- uso di un foglio di carta a perdere per ogni singola bovina;
- revisionare l'impianto di mungitura, garantendo un vuoto costante a 40-41 Kpa;
- asportare tutto il materiale di lettiera nelle cuccette e sostituirlo, previa disinfezione, con paglia o materassini.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Considerata la rapida diffusione della mastite da micoplasmi nella mandria e la refrattarietà a qualsiasi trattamento, la decisione è stata quella di eliminare immediatamente i soggetti infetti, anche sulla base della sola sintomatologia clinica.

Complessivamente, dal 21 marzo al 10 maggio 2011 sono state inviate al macello 55 bovine e 36 manze, di cui 21 positive all'esame batteriologico e 70 individuate con diagnosi clinica.

Sulle 19 bovine acquistate 8 sono state colpite da mastite da micoplasmi, di cui 4 provenienti dal Lussemburgo, 3 dalla Francia e una dai Paesi Bassi.

Da fine marzo a luglio 2011 sono stati prelevati 274 campioni con isolamento di *M. bovis* in 21 capi, evidenziando anche problemi di mastiti ambientali da *Staphylococcus aureus* coagulasi +, *Streptococcus uberis* ed *Escherichia coli*.

Gli ultimi due casi di mastite da *M. bovis* sono stati rilevati a fine maggio; nel periodo giugno-agosto i controlli batteriologici sono stati negativi e non sono stati segnalati altri casi di mastiti da micoplasmi.

In maggio e giugno 2011 la produzione di latte è risalita a 25-27 litri/die e il conteggio delle cellule somatiche è ritornato su valori di 250.000/ml.

Il pericolo di chiusura dell'allevamento è stato evitato con un piano d'intervento stringente, incentrato sulla pianificazione dell'eliminazione dei capi infetti e sospetti d'infezione, sulla frequenza dei controlli batteriologici, sulla gestione igienico-sanitaria degli animali e della mungitura.

La diffusione intra-allevamento dell'infezione da *M. bovis* è stata molto rapida, sia perché i micoplasmi possono essere eliminati prima dell'esordio clinico della mastite con ritardo nella diagnosi, sia per fattori legati all'igiene e all'ordine di mungitura e al funzionamento della macchina mungitrice.

L'origine dell'infezione in allevamenti indenni è spesso da ricondurre all'introduzione di animali infetti.

L'applicazione di misure di bio-sicurezza come la quarantena

degli animali acquistati, il controllo batteriologico del latte prima di inserire le bovine in allevamento a contatto con le altre, l'igiene della mungitura e il corretto funzionamento dell'impianto di mungitura sono fondamentali per controllare il rischio.

La gravità del focolaio insorto è commisurata all'evenienza contestuale dei fattori sopra esposti.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Arrigoni N., Belletti G.L., Cammi G., Garbarino C. (2010). Mastite bovina da *Mycoplasma*. *Large Animal Review*, 16, 35-38
- 2) Gonzalez R.N., Wilson D.J. (2003). Mycoplasmal mastitis in dairy herds. *Veterinary Clinics Food Animal Practice.*, 19, 199-221
- 3) Nicholas R.A.J., Ayling R.D. (2003). *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis and control. *Research Veterinary Science*, 74, 105-112
- 4) Pinnow C.C., Butler J.A., Sachse K., Hotzel H., Timms L.L., Rosenbuch R.F. (2001): Detection of *Mycoplasma bovis* in preservative treated field milk samples. *J. Dairy Sci.*, 84: 1640-1645.
- 5) Schalm O.W., Carrol E.J., Jain N.C. (1975). Le mastiti della bovina. *Edagricole*, Bologna, 328-331

INDICE DEGLI AUTORI

A

Abete M. C. 261, 284, 320, 376
 Abramo F. 94
 Acutis P. L. 299, 317
 Addante N. 315
 Adone R. 133
 Alba P. 52
 Alberti P. 232
 Alborali L. 39
 Alderete P. A. 52
 Alfano F. 255
 Alfonsi P. 162
 Aliberti F. 308
 Alio V. 187
 Altieri P. R. 135
 Altigeri A. 60
 Amagliani G. 322
 Amatiste S. 46, 170, 277, 362
 Amato G. 261, 336
 Ameri D. 350
 Ameri M. 56
 Amici A. 340
 Ammendola S. 154
 Amorusco F. 253
 Amoroso M.G. 98
 Amoruso R. 215
 Angeloni G. 114
 Angioi P. 203
 Anniballi F. 138
 Antoci F. 166
 Aprea G. 216
 Arcangeli G. 96
 Ariello D. 317
 Armas F. 265
 Armentano A. 140, 249
 Aronica V. 111
 Arras I. 251
 Arrigoni N. 108, 226
 Arsieni P. 310, 334, 336, 348
 Assaretti A. 289
 Audino V. 324
 Auricchio B. 138
 Auriemma C. 255
 Autorino G. 65
 Autorino G. L. 41, 60, 344
 Azzariti L. 76
 Azzarito L. 142

B

Bacciu D. 267, 271
 Baldi L. 207
 Balestrucci A. 90
 Balkema-Buschmann A. 293
 Bano L. 370
 Barbaro A. 144, 194, 219, 304, 360
 Barbato A. 54, 267, 269, 273
 Barbieri F. 210
 Barbieri I. 88, 247
 Barco L. 74, 79, 158
 Bartolotta A. 168
 Bassi A. M. 391
 Bassi S. 146
 Battisti A. 46, 48, 50, 52, 215
 Battistini R. 144, 372
 Battisti S. 162
 Battistoni A. 154
 Bazzardi R. 85
 Bazzucchi M. 68
 Bella E. 148
 Bellino C. 317
 Bellio A. 221
 Bellotti M. 88
 Belvedere M. 350
 Benedetti F. 108
 Benedetti V. 83
 Benedetto A. 261
 Berretta C. 263
 Bertasi B. 28, 100, 223, 312
 Berta V. 223
 Bertocchi L. 395
 Bertolotti L. 116
 Bertuzzi S. 317
 Biagetti M. 108, 111, 370
 Bianchi C. 350
 Bianchi D. M. 194, 221, 360
 Biasini G. 263
 Bichi G. 151
 Bicocchi R. 46
 Bilei S. 120, 151, 156, 236, 259, 382, 385
 Billone E. 257
 Bisceglia D. 125, 174
 Bogdanova T. 236, 259
 Bolsi I. 90

Bolzoni G. 395
 Börjesson S. 184
 Borriello G. 123, 154, 255
 Bortone N. 33, 174
 Bossù T. 156
 Bove D. 308
 Bovi E. 362
 Bozzano A. I. 368
 Bozzetta E. 94, 291, 293, 295, 324, 348
 Brambilla G. 391
 Brandi G. 322
 Bregoli M. 158
 Bresola M. 160
 Britti D. 380
 Brizio P. 320, 376
 Brocchi E. 326
 Bronzo V. 299
 Bruni G. 52, 215
 Brusa B. 304
 Buccella C. 52
 Buonanno M. 216
 Buonavoglia C. 58, 253

C

Caciolo D. 344
 Cagiola M. 108, 111, 352
 Camero M. 116
 Caminiti A. 162
 Cammi G. 226
 Campanella C. 210, 317, 391
 Campanile G. 265
 Caneglias E. 148
 Canelli E. 160, 247
 Canu A. 85
 Canu M. 63
 Caporali A. 108
 Caprioli A. 65, 81, 103, 151
 Capuano F. 308
 Caracappa S. 164, 166, 192, 378
 Caramelli M. 317, 324
 Cardamone C. 168
 Carfora V. 170, 277
 Carosielli L. 76, 174
 Carpana E. 146
 Carra E. 146

- Carratù D. 46, 52
 Carrozza M.L. 116
 Carta A. 275
 Casalnuovo F. 172
 Casalone C. 293
 Casamassima F. 128
 Casciari C. 68, 356
 Casoli L. 76
 Castelluccio A. 76
 Castiglioni B. 190, 299
 Casu S. 275
 Catella A. 160
 Catella C. 58
 Cattoli G. 96
 Cavalli A. 116
 Cavallo F. 340
 Cavallo S. 207
 Cavarretta M.C. 293, 295
 Ceccarelli P. 297, 306
 Cencetti E. 94, 205, 372
 Cenci F. 389
 Cerci T. 52
 Cerrone A. 154
 Cesarano D. 236, 385
 Checcarelli S. 108
 Chessa S. 190
 Chiapponi C. 39
 Chiaravalle A. E. 30, 33, 36, 125, 135, 174, 177, 212
 Chiavacci L. 144, 194, 219, 304, 354, 360, 387
 Chifari P. 232
 Chiocco D. 142
 Ciccotelli V. 376
 Cicero A. 257
 Cillara G. 172
 Cinquepalmi V. 180
 Cipri V. 342
 Circella E. 58
 Cirillo M. 308
 Cirone F. 253
 Ciullo M. 108, 111
 Civalleri N. 221
 Civettini M. 96
 Cocchi M. 158, 302
 Cocumelli C. 60
 Cogoni M. P. 120
 Cogoni P. 286
 Colarusso G. 207
 Colmegna S. 332
 Colussi S. 299
 Comin D. 74
 Compagnone D. 106, 182
 Consolati S. 245
 Consoli M. 312
 Cordaro G. 46, 215
 Cordioli P. 39, 160, 247, 326
 Corneli S. 108, 111
 Corrado F. 106, 182
 Corrà M. 184
 Corvonato R. L. 234
 Cosciani Cunico E. 71
 Cosma V. 391
 Costa A. 120, 187
 Cozza D. 123
 Cozzolino L. 216
 Cremonesi P. 190, 330
 Crisafulli A. 387
 Crisetti E. 142, 315
 Cristino M. 128
 Cubeddu T. 269
 Cucco L. 302, 370
 Currò V. 166, 192
 Cutarelli A. 98
D
 D'Alessandro M. 142
 D'Alessio N. 133, 216
 Dall'Aglio C. 297, 306
 Dalla Pozza M. C. 76, 79
 D'Alonzo A. 346
 D'Amato F. 180
 D'Amico S. 100, 223
 Daminelli P. 100, 196
 D'Angelo G. 302
 Davidse A. 293
 De Angelis V. 156, 236
 De Battisti C. 96
 De Carlo E. 255, 265, 279
 Decaro N. 118, 253
 Decastelli L. 194, 221, 360
 De Giuseppe A. 68, 352
 Dei Giudici S. 203
 Del Carlo M. 106, 182
 Del Frate S. 259
 De Liberato C. 156, 259
 Della Marta U. 65
 Dellepiane M. 205
 Dell'Oro D. 33
 Delogu A. 289
 Delvento P. 354
 De Meneghi D. 116
 De Mia G. M. 243, 356
 De Nadai V. 196
 Deotto S. 158
 De Pace R. 199, 201
 De Roma A. 98, 106, 182
 D'Errico V. 194, 304
 De Santis P. 151, 156, 236, 382, 385
 De Vita V. 336
 De Vito D. 180
 Di Bartolo I. 114
 Di Caccamo C. 338
 Di Cerbo P. 60
 Di Domenico I. 156, 236
 Di Donfrancesco B. 205, 336, 348, 372
 Di Egidio A. 156
 Di Giusto T. 158
 Di Marco V. 111, 340
 Di Matteo P. 215
 Di Noto A. M. 168, 187
 Dionisi Am. 79
 D'Ippolito N. 223
 Di Prisco F. 133, 216
 Di Stefano A. 142
 Di Taranto A. 241
 D'Oca M. C. 168
 Doglione L. 364
 Donati V. 215
 Dondo A. 230, 234, 354, 358
 Dottarelli S. 52
 Drigo I. 184
 Dumontet S. 308
 Dutto D. 261
E
 Eleni C. 60, 156, 162

Enache D. 210
Ercolini C. 144, 205, 219, 372
Esposito M. 182, 207

F

Fabbi M. 88, 332
Fadda A. 289
Fares C. 201
Farigu S. 269
Fasanella A. 90, 228
Fattaccio M.C. 85
Feliziani F. 68, 352
Feltrin F. 215
Fenicia L. 138
Fernández-Pinero J. 243
Ferrante G. 68, 352
Ferrantelli V. 166, 257
Ferrara A. 125, 174
Ferrari A. 210, 391
Ferrari M. 312
Ferrerri C. 81, 103
Ferretti E. 28
Ferri G. 41
Ferro G.L. 284
Ferrucci F. 330
Fezia G. 234
Fiasconaro M. 111
Fierro A. 71
Filippetti F. 277
Finazzi G. 71, 100
Fioravanti F. 320
Fioravanti M. L. 205, 334, 372
Fiore A. 138
Fiori A. 54, 267, 269, 271
Fiori E. 63
Flores Rodas E. M. 151, 236, 259
Floridi F. 36, 212
Florio T. 210
Foglini M. 322
Foni E. 39
Fontana R. 39, 247
Forletta R. 41, 344, 346
Forti K. 68, 352
Fragassi S. 194
Francaviglia F. 378
Franchino C. 199

Francia M. 133
Franco A. 46, 48, 50, 52, 215, 330
Friedrich K. 60
Frontoso R. 60
Fumanti P. 108
Fusco G. 216
Fusini F. 28, 100

G

Galante A. 232
Galiero G. 98, 106, 123, 154, 182, 216, 255
Galleggiante Crisafulli A. 219, 360
Galletti E. 50
Gallina S. 194, 221, 360
Gallo A. 255
Galluzzo P. 164
Galuppini E. 223
Galuppo L. 192, 378
Garbarino C. A. 226
Gargano V. 342
Garofolo G. 90, 228
Garrone A. 358
Gasparini M. 28
Gasperetti L. 344
Gavinelli S. 320
Gelmini L. 146
Gennero M. S. 364
Gesualdo G. 128
Giacinti G. 46, 170, 362
Giammarioli M. 243, 356
Giangolini G. 170, 277
Giangrossi L. 90
Giangrosso G. 166
Gili M. 284, 376
Giorgi I. 205, 230, 234, 334
Girardi S. 98
Giusti C. 346
Glorioso N. S. 232
Goffredo E. 76
González Alonso 92
Goria M. 144, 358
Gotelli S. 391
Gradi M. 108

Grande L. 81, 103
Granito G. 50
Grattarola C. 230, 234
Graziani C. 154
Greco S. 151, 236, 259
Grelloni V. 263
Grifoni G. 156
Groschup M. 293
Guardabassi Luca 44
Guarducci M. 239
Guarino A. 12, 98, 123, 133, 172, 182, 216, 279, 308
Guercio A. 164
Guglielmi F. 108
Gulino M. 221
Gustinelli A. 205
Guzzo S. 239

I

Iammarino M. 140, 241
Ianzano A. 48, 52
Ingravalle F. 94, 291, 293, 295, 324
Invernizzi E. 83
Iscaro C. 243
Iuculano G. 166
Iurescia M. 52

L

Labalestra I. 56
Laconca L. 30, 125, 177
Lamon S. 245
Langeveld J.P.M. 293
Lanzone V. 106
La Porta M. 33
Larocca V. 58, 253
La Salandra G. 142, 315
Latorre L. 120
Lavazza A. 58, 196, 247
Leblanc N. 243
Lelli D. 39, 160, 247
Leogrande M. 320
Leori G. S. 54
Leporati M. 376
Lettini A. 79

Lettini A. A. 74
 Licitra F. 378
 Lipari L. 192
 Lo Magro S. 140, 249
 Longo A. 76, 79, 158
 Loporchio R. 123
 Loprevite D. 293, 295
 Lorenzetti R. 52, 60
 Lorenzetti S. 215
 Lorenzoni G. 251
 Loria G. R. 338, 340
 Lorusso E. 58, 253
 Losio M. N. 28, 71, 100, 312
 Lo Verde V. 232
 Lucente M.S. 253
 Lucibelli M. G. 154, 255
 Luini M. 48, 83, 190, 330
 Lupo T. 232, 342
 Luppi A. 370

M

Macaluso A. 166, 257
 Maccabiani G. 28, 100, 196
 Maggi C. 221
 Magistrali C. 58
 Magistrali C. F. 302, 370
 Magliano A. 156, 259
 Maglio P. 182
 Magnabosco C. 96
 Maione E. 114
 Malascorta R. 182
 Maldera O. 324
 Manca A. F. 203
 Mancini P. 322
 Mancuso M. R. 148, 281, 393
 Mandola M. L. 56, 350
 Manfredini A. 88, 332
 Mangiacotti M. 33, 36, 135, 212
 Mangili P. 263, 302, 370
 Mangili P. M. 108
 Maniaci M. G. 317
 Manna G. 60, 65
 Manzardo E. 291, 295
 Marati L. 216
 Marceddu M. 245
 Marchesani G. 33, 36, 135, 212

Marchis D. 261
 Maresca C. 263
 Marianelli C. 111, 265
 Marianelli M. 60
 Marineo S. 164, 192
 Marini C. 297, 306
 Mari V. 253
 Marogna G. 54, 267, 269, 271, 273, 275
 Marongiu E. 85, 148, 251, 281, 393
 Marri N. 170, 277
 Martella V. 58
 Martelli P. 50
 Martorana C. 378
 Martucciello A. 265, 279
 Marziano M. L. 81, 103
 Mascarino D. 324
 Mascia I. 281, 393
 Masoero L. 387
 Massafra S. 284
 Massa M. 387
 Maurella C. 324, 354
 Mazza M. 291, 293
 Mazza R. 245
 Mazzei M. 116
 Mazzette R. 245
 Mazzone P. 108, 111
 Meinerio P. 376
 Mele P. 286, 289
 Mellia E. 364
 Meloni D. 94, 245, 291, 293, 295
 Menga V. 201
 Meoli R. 162
 Mercati F. 297, 306
 Mercurio V. 90
 Merialdi G. 50
 Miccolupo A. 83, 120
 Michelacci V. 81, 103
 Miedico O. 30, 125, 174, 177
 Migliazzo A. 232, 342, 378
 Milani C. 184
 Millone A. 261
 Minelli F. 81, 103
 Minorello C. 79
 Mioni R. 74
 Modesto P. 299, 317

Mogliotti P. 304, 310
 Monnier M. 230
 Monno R. 180
 Montagna C. 315
 Morabito S. 81, 103, 151
 Moreno A. 39, 247
 Moroni P. 299
 Moschidou P. 58
 Mudadu A. 251
 Mula G. 286
 Mureddu A. 245
 Muscarella M. 140, 249
 Mutinelli F. 94

N

Nardella M.C. 142
 Nardelli V. 128
 Nardini R. 41, 346
 Nassuato C. 28, 48, 83
 Nebbia P. 366
 NICOLA DONTI 25
 Nocilla L. 291
 Normanno G. 315
 Noworol M. 63

O

Oggiano A. 203
 Oggiano M. A. 281, 393
 Oliverio E. 71
 Olivo F. 284
 Omiccioli E. 322
 Onorati R. 215
 Oraziotti N. 322
 oria M. 354
 orrado F. 98
 Ortenzi R. 302, 370
 Orusa R. 56, 350
 Ostanello F. 114
 Ostorero F. 284

P

Paganelli G. L. 146
 Paiusco A. 74
 Palermo C. 249

Palleschi G. 239
 Palma A. 304
 Palmas B. 63
 Palmegiano P. 320
 Palumbo P. 168
 Panteghini C. 223
 Papa P. 108
 Paradiso R. 154
 Parente G. 279
 Parisani V. 194, 304
 Parisi A. 83, 120
 Pascucci L. 297, 306
 Pasquale V. 308
 Pasquali P. 111, 133, 154, 265
 Patriarca D. 277, 362
 Pavoletti E. 205, 310, 334, 336,
 348, 372
 Pavoni E. 312
 Pecchi S. 151
 Pedale R. 315
 Pedarra C. 315
 Peletto S. 299, 317, 350
 Pellegrino M. 261, 320
 Pellicanò R. 207
 Perin R. 184
 Perona G. 116
 Peroni S. 312
 Perria F. 374
 Pesciaroli M. 111, 154
 Petasecca D. 332
 Petruzzelli A. 322
 Petterino C. 210
 Pezzolato M. 94, 291, 293, 324,
 348
 Pezzoni G. 326
 Piazza M. 232, 342
 Picardeau M. 63
 Pietrini P. 277, 362
 Pilo C. 275
 Pinto P. 58
 Pintore A. 63
 Piraino C. 192
 Piras G. 251
 Piredda I. 63
 Pisano P. 378
 Pisanu M. 85, 286
 Pisoni G. 299

Pistone G. 295
 Pistone G.C. 376
 Pitardi D. 293, 328
 Poerio A. 380
 Pollera C. 330
 Poma Genin E. 261
 Pompa C. 30, 125, 177
 Pongolini S. 332
 Ponterio E. 114
 Ponti N. 63
 Porcaro F. 308
 Porqueddu G. 289
 Possidente R. 387
 Potenza M. 350
 Pozzi F. 48, 190, 330
 Pozzo L. 364
 Prati P. 88, 332
 Prearo M. 205, 310, 334, 336,
 348, 372
 Procopio A. 380
 Profiti M. 116
 Proietti A. 46
 Prudente C. 261
 Pugliese A. M. 216
 Puleio R. 338, 340
 Purificato I. 210

Q

Quasso A. 317

R

Raber A. 108
 Radaelli M. C. 354
 Ramon E. 76, 79
 Rapisarda G. 232
 Ratto A. 210, 391
 Reale S. 232, 342
 Renna G. 56
 Ricchi M. 108, 190, 226
 Ricci A. 74, 79
 Ricci I. 41, 344, 346
 Riccone N. 154
 Richelmi G. B. 324
 Righetti M. 205, 334, 336, 348,
 372

Rinaldi G. 65
 Rizzo F. 56, 350
 Rizzo G. 68, 352
 Robetto S. 56, 350
 Robino P. 366
 Rocca S. 269
 Romano A. 354
 Romano V. 308
 Rombolà P. 162
 Rosa G. 170, 362
 Rosa MN. 286
 Rosati S. 116
 Rosato G. 207
 Rosignoli C. 395
 Rosone F. 60, 65
 Rossi E. 243, 356
 Rossi F. 230, 234, 358
 Rossi M.L. 289
 Rossini I. 144, 372
 Rosso A. 304, 310
 Rosso C. 376
 Rosso F. 387
 Rota A. 184
 Rubinetti F. 219, 360
 Ruggeri F. M. 114
 Ruggiero V. 71
 Rupnik M. 308
 Russo Alesi E. M. 187
 Russo M. 111

S

Sabatini S. 344
 Sabatucci G. 71
 Saccardin C. 79
 Saccu C. 275
 Saetti F. 312
 Saezza M. E. 389
 Sagrafoli D. 46, 362
 Sala M. 41, 162
 Salamano G. 364
 Salis F. 267, 271, 273
 Salogni C. 146
 Salvarani S. 366
 Salza S. 85, 251
 Sanna G. 172, 251
 Santagada G. 120

Santoro E. 83
 Sant S. 144, 230
 Saragaglia C. 310, 348
 Sarrecchia E. 368
 Savoldi Boles M. 374
 Scanarotti C. 391
 Scaramella L. 151, 385
 Scaramozzino P. 41, 156, 162
 Scasciamacchia S. 90
 Scavia G. 81, 103
 Schianchi G. 54, 267, 269, 271, 273, 275
 Schiavetti I. 391
 Schiavo L. 279
 Schiavo M. R. 340
 Schiavone A. 364
 Sciarretta R. 253
 Scicluna M. T. 41, 60, 65, 344
 Sciortino S. 187
 Scoccia E. 263
 Scocco P. 297
 Sebastiani C. 302, 370
 Sechi S. 275
 Serpe F. P. 207
 Serracca L. 144, 205, 219, 372
 Serra G. 269
 Serra R. 221
 Serratrice G. 281, 393
 Serrecchia L. 90
 Severini S. 389
 Siclari E. 380
 Simula G. 374
 Simula M. 65
 Sini S. 389
 Siragusa G. 36, 212
 Soleo L. 180
 Sorbara L. 52
 Sorgia E. 395
 Soriani A. 247
 Sozzi E. 39, 160
 Spallucci V. 162
 Sperone V. 376
 Squadrone S. 320
 Squecco G. 158
 Stercoli L. 326

T
 Tamburello A. 338, 340
 Tamburro C. 133
 Tammara A. 46, 170, 362
 Tarallo M. 30, 125, 177
 Tarantola M. 364
 Tarasco R. 320
 Tardiola A. 239
 Tassinari M. 247
 Tedde T. 251
 Teneggi E.M. 94
 Tentellini M. 263
 Terrosu G. 289
 Tilola M. 28
 Tiso M. 210
 Tola A. 63
 Tola S. 172, 286
 Tolli R. 151
 Tolu S. 275
 Tonucci F. 322
 Torina A. 164, 378
 Torresi C. 68, 356
 Tozzoli R. 81, 103
 Tramuta C. 366
 Travaglio S. 387
 Trimboli F. 380
 Turno P. 391

U
 Uzzau S. 267, 271

V
 Valvini O. 123
 Varcasia B. M. 382, 385
 Varello K. 291, 293, 324, 348, 358
 Varisco G. 71, 100, 223
 Vazzana I. 340
 Vella A. 166, 257
 Vencia W. 234
 Veneziano V. 216
 Veschetti M.C. 46
 Vesco G. 164
 Vezzoli F. 48, 83
 Vicari D. 166

Vicari N. 56, 88, 332
 Vidili M. L. 203
 Viola E. 310
 Virgilio S. 251, 286
 Vitale F. 232, 342, 354
 Vitale N. 108, 144, 194, 219, 304, 354, 387
 Vita V. 199, 201
 Vitelli B. R. 389
 Vito G. 210, 391
 Vodret B. 148, 281, 393

Z
 Zaccaria T. 221
 Zanardi G. 395
 Zanardini N. 196
 Zanon R. G. 334
 Zinellu S. 203
 Zingaretti G. 263
 Zini M. 215
 Zoppi S. 230, 234, 358
 Zucca E. 330
 Zucchitta P. 362

Finito di stampare
nel mese di ottobre 2011
da Litografia La Ducale Srl - Parma